实用食物营养成分分析手册

杨月欣 王光亚 主编

SHIYONG SHIWU YINGYANG CHENGFEN FENXI SHOUCE



中国轻工业出版社

实用食物营养成分分析手册

杨月欣　王光亚　主编

中国轻工业出版社

图书在版编目(CIP)数据

实用食物营养成分分析手册/杨月欣,王光亚主编.
北京：中国轻工业出版社,2002.1
ISBN 7-5019-3276-X

Ⅰ.实… Ⅱ.①杨…②王… Ⅲ.食品营养分析-手册 Ⅳ.R151.3-62

中国版本图书馆CIP数据核字(2001)第047725号

责任编辑：沈力匀
策划编辑：沈力匀　责任终审：滕炎福　封面设计：崔　云
版式设计：丁　夕　责任校对：燕　杰　责任监印：胡　兵

*

出版发行：中国轻工业出版社(北京东长安街6号,邮编：100740)
网　　址：http://www.chlip.com.cn
联系电话：010—65241695
印　　刷：三河市宏达印刷有限公司
经　　销：各地新华书店
版　　次：2002年1月第1版　　2002年1月第1次印刷
开　　本：787×1092　1/16　　印张：16.25
字　　数：376千字　　印数：1—3000
书　　号：ISBN 7-5019-3276-X/TS·1979
定　　价：38.00元

·如发现图书残缺请直接与我社发行部联系调换·

序言

食物营养成分分析是一门研究食物的组成及含量的方法和原理的科学，食物营养成分的数据是描述食物中营养素分布和含量的资料。定量了解食物或食品中营养素含量的多寡，是食物资源的利用和开发、食品工业生产质量控制、食品检测和监督、农业生产和商业流通等发展的基础和技术支持，也是了解人群的营养状况，评价膳食的营养质量，设计和实施营养改善计划所必不可少的依据。

进入21世纪，随着化学分析新技术和营养学新理论的飞速发展，营养成分的分析和测定技术发生了较大的进步，许多灵敏度高、技术先进的方法得到广泛应用；这些进步促进了人们对食物中未知成分的不断发现，及对原有营养素或成分的更加深入地研究。例如碳水化合物、膳食纤维的分析测定技术，促进了其组成成分和分类学认识的改变。许多以前较难测定的营养成分，如叶酸、生物素、胆碱、可溶性膳食纤维等，随着对其测定数据的日益积累和方法学的完善，他们的功能性质及其对人类的营养作用已受到了广泛关注。另外，新资源食品、功能性食品的兴起，使得食物营养成分和功能因子的测定成为必需。营养成分的分析也从科学研究走上产品营养标签、监督检测、出具证据等的法律文件的高度。

1991年我们曾经出版了《食物营养成分测定方法》一书，在过去的10年中，它给食品分析工作者带来较大的帮助，现仍有不少读者索求此书。因10年中分析技术的进步，其内容和分析方法已不能适应目前需要，特别是中国即将加入WTO，食品的分析方法和标准与世界接轨已成为必然的趋势。为此我们重编了此书，即《实用食物营养成分分析手册》。这是我们在整理归档国家食品标准、国际法典委员会(CAC)和美国公职分析化学家协会(AOAC)方法接轨的基础上编写而成的，全部编写人员均为本方法的实际操作人员和国家标准的撰写者。希望编写中的注释部分能让读者有“实用”之感。它是一本现代的、能与国际标准方法接轨的应用手册，是从事食品营养成分分析的实验人员，包括食品卫生监

督、食品工业、营养学研究、大专院校有关人员的必备工具书。

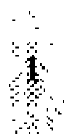
本书除介绍国家或AOAC的标准方法外，还介绍了其他可行的方法。由于时间仓促和水平所限，书中难免有不妥之处，希望读者及时提出以便更正。

杨月欣　王光亚

2001年6月

于北京

目录



第一章 食物营养的基础知识

食物是人类赖以生存的物质基础，是人类热能和营养素的来源，人们每天必须摄入一定数量的食物来维持自己的生命与健康，以保证身体的正常生长、发育以及从事各项活动。

食物一般包括粮谷类、豆类、蔬果类、禽肉类、鱼类、蛋类、奶类和食用油脂类等。目前所知，食物本身的化学成分多达上百种，包括营养成分、芳香类物质、色素类及生物功能性因子和酶类等。常见的营养素可为五大类：碳水化合物、蛋白质、脂类、无机盐(矿物质)和维生素。

评价一种食物营养价值，食物的营养成分的含量测定是其重要的方面，食物中所含的热能和营养素的种类和含量高低，其营养素/能量密度的比例是否合理，对于满足人体需要的程度等等，都需要营养成分的分析测定数值。掌握并研究它们的方法，依靠其进行科学管理人类食物资源和控制食品质量，是营养学家和食品化学家共同的目的。

第一节 营 养 素

食物中含有多种营养素，本书中仅就测定方法所检测的各种营养素的特性做一简介，其目的在于试样制备过程中尽可能减少待测营养素的损失，以及在检测过程中根据该营养素的理化特性而使所测营养素在检测过程中减少破坏，从而使食物中营养素的检出量接近真实的含量。将食物中营养素分为三大类，分别列出其理化特性。

一、近 似 成 分

食物中的蛋白质、脂肪、碳水化合物和水分、灰分等营养成分在分析方法上称之为近似成分。因为这些检测方法所测出的仅是粗蛋白、粗脂肪和灰分等。例如，食物中的非蛋白氮也被计算成蛋白质，能溶于乙醚中的物质也被算成脂肪；凡能在100℃挥发的物质均被当作水分；凡是在马福炉中不被高温燃烧的均是灰分；碳水化合物不是直接测定的，而是用减差法计算出的。这些营养素在食物中的含量是用近似分析法检测的，故称之为粗的成分或近似的成分。这些“近似成分”在食物中均有其各自的化学结构和理化特性。仅就蛋白质、脂肪、碳水

化合物的理化特性做一概述。

1. 蛋白质

动、植物食品中的蛋白质均由20余种氨基酸所组成。氨基酸约占蛋白质重量的16%。故在测定蛋白质时将所测出的氮量乘以6.25(100÷16=6.25)即换算成蛋白质之量;小麦面筋中氨基酸的含量为17.5%,因此在计算成蛋白质含量时乘以5.70,其他一些食物中的蛋白质的含量均以其氨基酸组成的含氮比换算成蛋白质的计算因子,由各种计算因子计算相应的食物中蛋白质之量。表1-1列出几类食物中蛋白质计算因子。

表 1-1 蛋白质计算因子

食物	计算因子	食物	计算因子
蛋	6.25	大麦,燕麦等	5.83
肉及肉制品	6.25	小麦	5.80
鱼及禽类	6.25	玉米、高粱	6.25
乳及乳制品	6.38	小麦面全麦	5.83
动物胶(明胶)	5.55	普通粉及精粉	5.70
水果、蔬菜类	6.25	米	5.95
核桃和榛子	5.30	豆类	6.25
花生	5.46	黄豆(大豆)	5.71
芝麻、向日葵子	5.30	其他食物	6.25
麸皮	6.31		

蛋白质是一类化学结构非常复杂的有机化合物,其基本要素为碳、氢、氧、氮4种元素。有些蛋白质还含有硫、磷、铁、硒、碘等其他元素构成特殊的蛋白质。蛋白质的基本组分为氨基酸。常见的氨基酸有20余种,它们以不同的数量和排列顺序构成不同生理功能的蛋白质。

2. 脂肪和脂肪酸

脂肪是脂类的一种。脂类也称脂质,它包括两大类物质。一类为中性脂肪,一般称为脂肪,化学结构为甘油三酯,由一分子甘油和三分子脂肪酸组成。另一类是类脂,包括磷脂、糖脂、固醇类及脂蛋白等。食物中的脂类中绝大部分是中性脂肪,类脂仅占少量。因此将食物中的脂类统称为脂肪。

脂肪不易溶于水而溶解在有机溶剂中。食物中的脂肪通常用乙醚提取后挥发去乙醚,所剩之物即称之为粗脂肪,因为其中包含有可溶于乙醚的少量非脂肪物质。

脂质的脂肪酸可分为短链(碳原子数少于6个)和中链(含6~11个碳原子)和长链脂肪酸(含12个以上碳原子)。这是按脂肪酸所含碳链的数量而分的。同时也将脂肪酸按饱和及不饱和程度而分为饱和脂肪酸(不含双键)单不饱和脂肪酸(含一个双键)和多不饱和脂肪酸(含2个以上双键)。食物中主要的饱和脂肪酸是软脂酸($C_{16:0}$)和硬脂酸($C_{18:0}$),主要的单不饱和脂肪酸是油酸($C_{18:1}$)。植物性食

物中主要含不饱和脂肪酸而动物性食品中主要含饱和脂肪酸。鱼类油脂中不饱和脂肪酸多于饱和脂肪酸而且还含有多不饱和脂肪酸，如 $C_{20:5}$(EPA)和 $C_{22:6}$(DHA)。

3. 碳水化合物

食物中的碳水化合物是糖和碳水化合物的复合物(它由碳、氢和氧三种元素组成)。碳水化合物中还可包括膳食纤维，它是一类不为人体消化酶所消化的一组化合物。糖有单糖，如葡萄糖和果糖；双糖，如蔗糖、麦芽糖和乳糖等。碳水化合物包括淀粉、多糖和膳食纤维。淀粉是葡萄糖的聚合体。膳食纤维是来自植物细胞壁的非淀粉多糖，它包括纤维素、半纤维素、果胶、树胶及藻多糖，另外木质素在化学结构上不是多糖类，但因检测方法不能排除，也就将木质素包括在膳食纤维中。

粗纤维是 20 世纪 80 年代以前在食物成分中的一种称谓。粗纤维的检测方法是用强酸和强碱消化方法，所测的粗纤维不能代表人体内不可消化的膳食纤维。由于科学的进步，营养学研究中重视了膳食纤维对人体健康的重要性，而相应地发展和更新了膳食中纤维素的测定方法，并且废弃了粗纤维的检测方法，改用当前国际通用的"酶－重量法"分别检测植物性食物中总的和可溶性及不可溶性膳食纤维。当前各国食物成分表中的碳水化合物的含量基本上是用减差法计算的结果而非检测结果。本书中碳水化合物也采用减差计算法。

二、维　生　素

维生素是一类微量营养素，它不能给人类提供能量，也不是人体组织结构的组成成分，但它们是人体内许多酶的成分。人必须从食物中摄取这些微量营养素才能维持健康。现已知的有十余种，根据它们在脂肪或水中溶解的性质，可分为两大类。

1. 脂溶性维生素

(1) 维生素 A(V_A)：维生素 A 的化学结构为视黄醇。动物性食品中含有维生素 A，主要是维生素 A 酯。维生素 A 是脂溶性长链醇，它有许多异构体。在哺乳动物组织中最常见的异构体是全反式视黄醇。维生素 A 溶于脂肪和脂肪溶剂，不溶于水。维生素 A 尤其是它的游离醇，对氧、酸和紫外线很敏感。

自 20 世纪 60 年代起，维生素 A 的含量已改用微克"视黄醇当量"表示，即 1 国际单位(IU)＝0.3μg 视黄醇，1 个视黄醇当量(RE)＝1μg 视黄醇。1μg 视黄醇相当于 0.344μg 醋酸视黄醇酯。

(2) 胡萝卜素。胡萝卜素又称维生素 A 原。植物性食品中含有胡萝卜素，它常以酯化形式存在。胡萝卜素有其特殊结构，它含有两个白芷酮环，在加氧酶的催化下，1 分子 β－胡萝卜素可生成 2 分子视黄醇。胡萝卜素有 α、β、γ 和 δ 等构型。β－胡萝卜素在人体内可转变维生素 A。二者均含有 β－白芷酮的环状结构，它是具有生物活性的成分。β－胡萝卜素和维生素 A 所含的双键全部为反式结构。天

然存在约600种类胡萝卜素中,只有约50种多种有维生素A的活性,其中以β-胡萝卜素的活性最强。一个国际单位(IU)的β-胡萝卜素相当于0.6μg胡萝卜素,6$\mu g \beta$-胡萝卜素相当于1μg视黄醇,12μg其他类胡萝卜素(维生素A原)。1000IU维生素A≈300μg视黄醇,1μg维生素A(RE)≈3.3IU维生素A≈6$\mu g \beta$-胡萝卜素。胡萝卜素对热不稳定,但对光尤其是紫外线和氧的敏感。

(3) 维生素D(V_D)。维生素D包括两种化合物,即麦角钙化固醇(维生素D_2)和胆钙化固醇(维生素D_3)。维生素D_2来自植物,通过日光中紫外线的照射转变成有维生素活性的维生素D_2,维生素D_2可以人工合成。动物和人皮肤内7-脱氢胆固醇经过光化学反应转化成维生素D_3。人经常接受日光照射,皮肤内的7-脱氢胆固醇就能内源生成,可以不需由膳食提供。维生素D不溶于水,易溶于酒精和其他有机溶剂,在植物油中的溶解度较小。

(4) 维生素E的化学结构为生育酚。在自然界中存在着α、β、γ型和δ型的生育酚,其构形特点是都具有一个环状结构及一条长饱和侧链,其差别在于环中的甲基数目与位置不同,其生理活性以α-生育酚最高。一个国际单位的生育酚相当于1mg dl-α醋酸生育酚的生物活性。酯类的生物活性比游离生育酚高。在体外试验中生育酚具有抗氧化作用,但生物活性最强的α-生育酚的抗氧化作用却最弱。维生素E是一种天然的生物抗氧化剂,其中δ-生育酚是最有效的抗氧化剂。α-生育酚是黄色的油状物,不溶于水而溶于有机溶剂,如丙酮、乙醇、三氯甲烷、乙醚以及其他的脂肪溶剂中。它很容易氧化,其醋酸盐具有相似生物活性且比较稳定。维生素E对可见光稳定但易被紫外光破坏。生育酚受295nm波长光线照射可发出荧光。在无氧情况下稳定,它们对热和碱且对酸也较稳定。但在有氧环境中会受逐渐氧化,遇碱则更易破坏。

(5) 维生素K(V_K)。维生素K是指一组酯类的化合物(维生素K_1存在于植物叶中如蔬菜和大豆油中;维生素K_2则存在于微生物中如细菌、酵母等),它们都具有抗出血的作用。维生素K_1和维生素K_2(分别又称α-叶绿醌和β-叶绿醌)是自然界存在的维生素K,已合成的具有活性的类似物有维生素K_3、维生素K_4和维生素K_5;它们有生物活性是因为能在人体内转化成有生理作用的维生素K_2,即在3位碳原子有20个碳原子(4个异戊二烯基)的异戊二烯侧链。天然存在的维生素K为脂溶性的、人工合成的为水溶性的。维生素K对热和还原剂都稳定但易被光、酸、碱和氧化剂及醇破坏。

2. 水溶性维生素

(1) 维生素B_1(V_{B_1}):又称硫胺素,由一个嘧啶和一个噻唑组成。维生素B_1存在于植物性食物,如酵母、谷物的麸皮和胚中含量较丰富,但也含在动物性食品中。硫胺素为白色晶体,溶于水,不溶于有机溶剂,很易受热或氧化而遭破

坏，尤其是在碱性环境中更易破坏，但在酸性溶液中加热至120℃ 0.5h 也稳定。维生素 B_1 在干燥情况下很稳定，不受空气氧化。维生素 B_1 在食物中有多种形式，如以游离的、和蛋白质结合的，或单、双及三磷酸酯的形式存在。

（2）维生素 B_2(V_{B_2})：又称核黄素，它是具有一个核糖醇侧链的异咯嗪的衍生物，是橙黄色晶体。维生素 B_2 广泛存在于动植物性食物中，富含于绿色蔬菜和动物肉中，尤其是肝脏中。维生素 B_2 在常温下不受空气中氧化影响，耐酸和耐热，但在碱和光中不稳定，微溶于水，在溶液中呈强的黄绿色荧光；在强酸溶液中稳定，在碱性条件下或在可见光以及紫外光线中不稳定，但在微弱的人工光源中尚稳定。

（3）维生素 PP(V_{PP})：又称烟酸。维生素 PP 的化学结构为吡啶 β－羧酸，烟酰胺是相应的胺。维生素 PP 广泛存在于动植物性食物中，特别富含于鱼和肉中；在植物性食物如谷类、蔬菜中维生素 PP 多以人体不能利用的结合型存在，此种结合型可以用碱处理而使它具有生理活性的维生素 PP。维生素 PP 的白色结晶易溶于水，微溶于乙醇，不溶于乙醚。它们对热、光、空气或碱都不敏感。烟酰胺（或称烟酰胺）在酸或碱溶液中被水解成为烟酸。

（4）维生素 B_6(V_{B_6})：维生素 B_6 是一类化合物，包括吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺。此外还有相应的磷酸盐化合物即 5－磷酸吡哆醇、5－磷酸吡哆醛和 5－磷酸吡哆胺等 6 个构型。它们广泛存在于动、植物性食物中，多与氨基酸结合。维生素 B_6 的各种形式均易溶于水，在空气中稳定，在酸性溶液中吡哆醛和吡哆胺对热比较稳定，但在碱性介质中则对热不稳定。它们在中性或碱性环境中易被光破坏，维生素 B_6 是白色结晶物，易溶于水而不易溶于乙醇。

（5）泛酸：又称维生素 B_5，有时也称为维生素 B_3，现在的统一名称为泛酸。其化学结构为二羟基 β,β－二甲基丁酰 β－丙氨酸。它具有旋光性，只有右旋型才有维生素的生理活性。泛酸是一种黄色黏滞的油状物，但它的盐是泛酸钙，是无色结晶。泛酸钙不溶于有机溶剂，而溶于乙醇和水。泛酸的水溶液在酸性和碱性条件下，对热不稳定。泛酸以结合形式广泛存在于食物中，它在食物中较稳定。酵母、动物肝脏中富含泛酸。

（6）维生素 B_{12}($V_{B_{12}}$)：又称氰钴胺，是一组含钴的类咕啉化合物，其结构为 4 个吡咯环形成的一个大环，中心为一个钴。它的化学名为 α－5,6－二甲基苯并咪唑－氰钴酰胺。维生素 B_{12}为红色结晶，易溶于水和乙醇，但不溶于丙酮、氯仿和乙醚，在 pH4.5～5.0 的弱酸介质中最稳定，遇强酸或强碱则分解。维生素 B_{12}易被强光尤其是紫外线破坏。它对常温稳定，但长时间加热则易破坏。维生素 B_{12}在食品中分布不广，主要含在肉类食品中，尤其是肝脏中含量较多，另外臭豆腐乳中也含有维生素 B_{12}。

（7）叶酸：叶酸是一种重要的 B 族维生素，其化学名称为蝶酰谷氨酸，是由

一组与蝶酰谷氨酸的生理功能和化学结构相似的一类化合物所组成。蝶酰谷氨酸有蝶啶核、对氨基苯甲酸及谷氨酸组成;蝶酸三个谷氨酸分子组成为蝶酰三谷氨酸,或由7个谷氨酸分子组成蝶酰七谷氨酸都具有生物活性。叶酸是橙黄色的结晶状粉末,无臭无味,不溶于醇和乙醚,微溶于水。叶酸对热、光线和酸均不稳定,但在碱性和中性介质中对热也稳定。叶酸存在于所有绿叶蔬菜中,富含在肝脏中,但在肉、蛋及奶中也含有一定量的叶酸。

(8) 胆碱:胆碱是一种强的有机碱,它以磷酸酯或以乙酰胆碱的形式广泛存在于自然界中。胆碱的化学结构为 β-羟乙基-3-三甲基氨的氢氧化物。胆碱为无色的黏稠性液体,有很强的吸湿性,易溶于水、甲醇、乙醇和丙酮中。稀的胆碱水溶液比浓溶液对热稳定。胆碱与酸反应生成的盐如氯化胆碱对热比较稳定。胆碱广泛存在于食物中,富含于肝脏、花生、大豆及莴苣中。

(9) 生物素:生物素也称为维生素 B_7 或维生素 H。它是一个噻吩环的脲环衍生物,共有8个异构体,但又有一种具有维生素的生物活性,即 d-(+)生物素。生物素为白色结晶,对空气、热和光稳定,但在强酸或强碱介质中易于降解。生物素微溶于水和乙醇,不溶于乙醚、丙酮等有机溶剂。生物素广泛存在于天然食物中,但含量均较少,仅少数食品如酵母、肝脏、肾脏、糖蜜及油脂的种子中较丰富。

(10) 维生素 C(V_C):又称为抗坏血酸。化学结构为6个碳原子的 α-酮基-L-呋喃古洛糖酸内酯的弱酸。自然界中仅 L-抗坏血酸及其脱氧形式具有生理活性。维生素 C 为无色结晶,易溶于水,微溶于乙醇和丙酮,维生素 C 的结晶体在空气中稳定,但在水溶液中易被空气中的氧或其他氧化剂所氧化生成脱氧型抗坏血酸,并可再进一步氧化而失去维生素的生物活性。维生素 C 是蔬菜与水果中的主要维生素,富含于深色蔬菜和酸味水果中。

三、矿 物 质

人体需要的矿物质有20余种。在人体中含量较多的有钙、磷、钾、镁、钠、氯、硫等7种,称之为常量元素。另外还有14种微量元素,它们在人体内含量很少,但各具有一定的生理功能,必须由食物供给。这些元素包括铁、锌、铜、锰、铬、钼、钴、镍、锡、钒和硒、碘、硅以及氟等。它们的化学特性分别简述如下。

1. 常量元素

(1) 金属元素:钙(Ca)、钾(K)、钠(Na)、镁(Mg)是金属元素,均具有金属共有的特性。钙、镁属碱土金属,钙常以 $CaCO_3$、$CaSO_4$ 等化合物形式存在,以二价阴离子组成的盐难溶于水。镁常以二价盐的形式存在,如硫酸镁、磷酸镁以及碳酸镁、氯化镁等。钾和钠均为碱金属,为较活泼的金属,其主要的盐类是 KCl 和 NaCl。

(2) 非金属元素:磷、硫和氯均为非金属元素。磷在自然界中主要以磷石

灰和磷钙上存在，碱金属或碱土金属与 PO_4^{3-} 结合生成磷酸盐类，磷与脂类可形成磷脂，如卵磷脂等。硫的化学性质与氧相似，能与碱金属、碱土金属激烈反应，形成硫化物，多数蛋白质中含有硫。氯在室温下为黄绿色气体，易被液化，其化学性质非常活泼，为强氧化剂。氯与金属及非金属能形成氯化物，最常见的与人体健康有关的为氯化钠。

2. 微量元素

(1) 金属元素：14 种人体必需微量元素中铁、锌、铜、锰、铬、钼、钴、镍、锡和钒等 10 种为金属元素，其中前 7 种是较为重要的元素

铁在固态时以金属或铁的化合物形式存在，在水溶液中则以亚铁(Fe^{2+})或高铁(Fe^{3+})形式存在，两种形式易相互变换。大多数具有生理功能的铁是以血红蛋白的形式存在。

锌常以硫化物存在于矿物质中，锌的化学特性是正电性，但不参与氧化还原作用。锌在人体内为多种酶的组成成分之一。

铜是过渡金属，具有氧化还原性质，可以释放或接受电子。它在生物体内常以 Cu^{2+} 形式存在。在人体内是铜蛋白的组成成分之一，以及为许多氧化酶的组成成分之一。

锰是一种过渡元素，可以有　3 价到 + 7 价的化合物，并以 11 种氧化态存在于自然界中，人体内含锰的酶大多数是 Mn^{2+}。

铬是一种耐腐蚀的金属，常见的化合物为氧化铬、铬酸钾等；吡啶甲酸铬是葡萄糖耐量因子，其铬是三价铬，在食物中多为 Cr^{3+}，而 Cr^{6+} 有毒性。

铬是一种耐腐蚀的金属，常见的化合物为氧化铬、铬酸钾等；吡啶甲酸铬是葡萄糖耐量因子，其铬是三价在食物中的多为 Cr^{3+}，而 Cr^{6+} 有毒性。

钼是过渡元素，极易改变其氧化状态，在体内氧化还原反应中起电子传递的作用，也是许多金属酶的组成分。钼在体内的另一种形式是钼酸盐。

钴是铁系元素，其化合价有 2 价和 3 价，钴的化合物常具颜色，可作为化妆品的颜料。钴是维生素 B_{12} 的重要组成分，还是几种酶的重要组分。

镍、锡和钒在人体健康中的研究较少，其理化性质在本文中从简。

(2) 非金属元素：人体需要的非金属微量元素有碘、硒、硅和氟。

碘(I)：碘是卤族元素之一，是一种强氧化剂，在常温下呈黑色或蓝黑色的晶体，在 0～55℃ 由晶体升华为气体。碘以 I_2、I^0、I^{-1} 或 IO_3 形式存在，并可与多种元素化合。KI 和 KIO_3 是强化食盐的主要碘源。海水中含碘最丰富，但在自然环境中分布不均匀。碘是人类必需的微量元素。

硒(Se)：为非金属元素，有几种同素异形体，可呈无定型或晶体存在。硒的化合物对人、畜均有毒，但也是必需的微量元素。硒的盐类如亚硒酸钠用于强化

表 1－2

某些数量营养素的 ULs

年龄/岁	钙 /mg	磷 /mg	镁 /mg	铁 /mg	碘 /μg	锌 /mg		硒 /μg	铜 /mg	氟 /mg	铬 /μg	锰 /mg	钼 /μg	维生素A /μgRE	维生素D /μg	维生素B_6 /mg	维生素C /mg	叶酸 /μg DFE#	烟酸 /mg NE*	胆碱 /mg
0～				10				55		0.4							400			600
0.5～				30		13		80		0.8							500			800
1～	2000	3000	200	30		23		120	1.5	1.2	200		80			50	600	300	10	1000
4～	2000	3000	300	30		23		180	2.0	1.6	300		110	2000	20	50	700	400	15	1500
7～	2000	3000	500	30	800	28		240	3.5	2.0	300		160	2000	20	50	800	400	20	2000
						男M	女F													
11～	2000	3500	700	50	800	37	34	300	5.0	2.4	400		280			50	900	600	30	2500
14～	2000	3500	700	50	800	42	35	360	7.0	2.8	400		280			50	1000	800	30	3000
18～	2000	3500	700	50	1000	45	37	400	8.0	3.0	500	10	350	3000	20	50	1000	1000	35	3500
50～	2000	3500▲	700	50	1000	37	37	400	8.0	3.0	500	10	350	3000	20	50	1000	1000	35	3500
孕妇	2000	3000	700	60	1000		35	400						2400			1000	1000		3500
乳母	2000	3500	700	50	1000		35	400									1000	1000		3500

* NE＝烟酸当量

DFE＝膳食叶酸当量

▲ 60 岁以上磷的 UL 为 3000mg。

（凡表中数字缺如之处表示未制定该参考值）

食盐以补充我国缺硒地区人群的硒摄入量。

氟(F)：氟的化学特性是与正价元素结合成化合物。氟以少量且以不同浓度存在于土壤、水及动植物中，所有食物也都含有不同浓度的氟。氟化物有毒并有强腐蚀性。在中国有低氟地区，也有氟中毒地区。氟也是人体必需营养素。

硅(Si)：硅为非金属，主要以二氧化硅和硅酸盐的形式存在于自然界中，且分布极广。硅是人体软骨和结缔组织必需的元素，也是合成黏多糖的必要成分。

某些数量营养素的 ULs 如表 1-2 所示。

第二节 食物中的营养素

一、营养素的食物来源

食物是供给人体热能及各种营养素的物质基础。食物种类很多，依据其性质和来源可大致分为两类：动物性食物，如畜禽肉类，鱼、虾等水产食品、奶蛋类等；植物性食物，如粮谷类、豆类、蔬菜水果类、薯类和坚果类等。

食物的营养价值通常是指食物中所含营养素和热能能满足人体营养需要的程度而言，目前常用营养素/能量的密度来表示。一般而言，仅提供空白能量的食物并不被认为是营养价值高的食物。在天然食物中，营养素的分布与含量并非是十分均衡的，它们都有各自的特点。

1. 谷类食物的营养素分布

谷类子粒都有相似的结构，包括谷皮、糊粉层、胚乳和胚芽。各结构所含营养成分差别很大，如淀粉全部集中在胚乳的淀粉细胞中；蛋白质以糊粉层和胚中的浓度最大，糖分也大部分存在于胚乳和淀粉细胞内，膳食纤维有 3/4 存在于谷皮中，灰分则以糊粉层的含量最高。就整个谷粒的含量来看，各种营养素的含量分别为：

(1) 蛋白质的含量一般变动在 7.5%～15%之间，并随粮食的种类、品种、土壤、气候及栽培条件等的不同而异。禾谷类蛋白的特点是赖氨酸含量都很少，特别是玉米蛋白缺少赖氨酸和色氨酸的情况最为突出。禾谷类粮食中以大米蛋白质质量较好，因其赖氨酸含量较多。麦胚和米胚中含赖氨酸较多，但加工后，胚的大部分被除去。

(2) 碳水化合物的含量很高，其中淀粉占碳水化合物总量的 90%左右，是人体最理想又经济的热量来源。其中游离糖(单糖和双糖)约占碳水化合物的 8%左右。

(3) 脂质的含量较少，约 2%，多为不饱和脂肪酸，其中亚油酸含量占 60%，还有少量的植物固醇和卵磷脂。

(4) 无机盐含量约为 1.5%～5.5%，以磷最多，占 50%左右。谷类中 Ca 含

量不高,Fe更少。

(5) 谷类食物是膳食中B族维生素的主要来源,泛酸、烟酸、硫胺素、核黄素的含量都较高,小麦胚中含较多的维生素E,谷类食物中不含维生素C、维生素A、维生素D。

2. 豆类、坚果类及油料作物的营养素分布

(1) 大豆中蛋白质含量较高,约占35%～40%,大豆蛋白质是最好的植物性优质蛋白含有丰富的赖氨酸,但含硫氨基酸不足。脂肪占15%～20%,不饱和脂肪酸高达85%(亚油酸高达50%以上)。碳水化合物相对较少。大豆有较多的Ca和硫胺素,核黄素含量也较高。

(2) 坚果类包括花生、葵花子、核桃、松子等,油脂含量高达44%～70%,蛋白质含量约为12%～25%。

(3) 大豆类还有一些活性物质,如皂苷类和黄酮类等,具有降血脂等功能;还有一些抗营养因子如胰蛋白酶抑制剂和胀气因子等。

3. 蔬菜水果中的营养素分布

蔬菜水果中含有多种营养成分,特点是蛋白质和脂类含量很低,无机盐和某些维生素的含量很丰富。并且它们具有良好的感官性状,可增进食欲帮助消化,维持肠道正常功能。

(1) 蔬菜水果所含的碳水化合物包括:糖、淀粉、纤维素、半纤维素和果胶等,蔬菜类中胡萝卜含量较高,薯类、芋类等含淀粉较高;水果中苹果、梨等以果糖为主,桃、杏等含蔗糖较多,葡萄、草莓、猕猴桃等则主要是葡萄糖和果糖。蔬菜水果还是膳食纤维的重要来源。

(2) 蔬菜水果类是人体无机盐的重要来源,对维持人体的酸碱平衡也很重要。如Ca、Mg、K、Na、Cu等,有些蔬菜还含有丰富的Fe。但一些蔬菜中含有一定量的草酸,对Ca、Fe的吸收利用产生不利的影响。

(3) 除维生素A、维生素D外,其他维生素在蔬菜水果中均广泛存在,其中维生素C和胡萝卜素含量十分丰富。

(4) 蔬菜水果中还含有各种芳香物质和色素,可刺激食欲促进食物的消化吸收;水果中含有各种有机酸,如苹果酸、柠檬酸和酒石酸等,可刺激消化液分泌并保持维生素C的稳定。

4. 畜、禽肉和鱼类的营养素分布

畜肉、禽肉和鱼类食品含有丰富的各种营养素,是人类重要的动物性食品,也是人类蛋白质、脂肪矿物质和维生素的重要来源之一。

(1) 畜肉蛋白质含量在10%～20%,大部分存在于肌肉组织中。存在于结缔组织中的胶原蛋白和弹性蛋白,由于色氨酸、酪氨酸、蛋氨酸等含量很少,故属

于不完全蛋白质;畜肉中脂肪含量波动较大,一般在10%~90%之间,平均含量10%~30%,以饱和脂肪酸为主,熔点较高,胆固醇含量也较高;碳水化合物主要以糖原的形式存在于肌肉和肝脏中,含量很少;畜肉含矿物质约0.6%~1.1%,肝脏和肾脏中含铁很高并且很容易吸收,但畜肉中钙含量不高;另外,畜肉中含丰富的B族维生素,猪肉中的硫胺素明显高于牛、羊肉。肝脏富含维生素A和维生素D,铁、锌等矿物质含量也相当丰富。

(2) 禽肉的营养价值与畜肉基本相似,质地细嫩,容易消化吸收。蛋白质约占20%,属于优质蛋白;脂肪含量很少,熔点低,易于消化吸收,并含有20%的亚油酸;钙、磷、铁等矿物质含量较丰富,禽肉中还含有一定量的维生素E,故禽肉在-18℃冷冻条件下贮藏一年也不会酸败。

(3) 鱼类的营养素组成因鱼种、年龄、捕捞季节不同而异,一般讲鱼肉的化学组成与畜肉比较接近。蛋白质约占15%~20%,氨基酸组成较平衡,但色氨酸含量较低,肌纤维短细,更易消化吸收;脂肪含量约1%~10%,主要存在皮下和脏器周围,呈液态,熔点较低,易氧化酸败;矿物质含量为1%~2%,磷含量最高,其中钙的含量多于禽肉。虾皮含钙高达2%,海产鱼还富含碘;鱼类是核黄素和烟酸良好来源,但新鲜鱼不及时烹调处理,硫胺素易被破坏。

5. 乳及乳制品的营养素分布

乳类制品是一种营养丰富,食用价值很高的食品。包括液态乳、奶粉、酸奶、奶酪、炼乳等等。提高乳类制品消费量,对增加优质蛋白质和钙的供应具有重要意义。

(1) 乳中蛋白质含量约3%,消化吸收率高,其必需氨基酸组成及含量与人体模式接近,是优质蛋白质。牛奶中酪蛋白含量高而乳清蛋白含量较低。

(2) 乳中脂肪含量约为3%~5%,呈微粒分散于乳中,易消化吸收。已确定的脂肪酸有400余种。其中挥发性脂肪酸含量高。油酸含量占30%,亚油酸和亚麻酸分别占5.3%、2.1%。每1g脂肪含3mg胆固醇。

(3) 乳中的碳水化合物主要为乳糖,含量较人奶(7%)低,约5%左右。酸奶、乳酪中含5%左右。

(4) 牛奶中无机盐含量约0.6%~0.7%,富含Ca、P、K。其中钙含量尤为丰富,约为100%容易消化吸收,但奶中铁含量很低。

(5) 乳中维生素A含量较高,约在0.37~0.80mg/100g。维生素D含量不高,夏季日照多时,其含量也可有一定的增加。牛奶制品也是维生素B_2(0.14%~0.18%)、泛酸(0.36mg/100g)、肌醇(16.0mg/100g)和胆碱(17~30mg/100g)的良好来源。

6. 蛋类食品中的营养素分布

蛋类的可食部分主要由蛋清和蛋黄组成,分别占可食部分的2/3和1/3。

(1) 蛋清中的营养素主要是蛋白质,含有人体所需要的氨基酸,其组成模式

与人体很接近，几乎能被人体完全吸收利用，是食物中最理想的优质蛋白质；另外，蛋清也是核黄素的较好来源。

（2）蛋黄中还有较多的营养成分。钙、磷、铁等无机盐多集中于蛋黄；还含有较多的维生素 A、维生素 D、维生素 B_1 和维生素 B_2。蛋黄中还含有较多的磷脂和胆固醇。

（3）蛋类中也含有一些抗营养因子，如卵黄高磷蛋白可干扰铁的吸收。生蛋清中的抗生物素可妨碍生物素的吸收，抗胰蛋白酶可抑制胰蛋白酶活力，但当蛋煮熟时，这两种物质可被破坏。

根据营养与食品卫生研究所 1991 年出版的《食物成分表》，几种常见的营养素含量丰富的食物如表 1－3 所列至表 1－11 所列。

表 1－3　　蛋白质的主要食物来源

食物名称	蛋白质含量/(mg/100g)	食物名称	蛋白质含量/(mg/100g)	食物名称	蛋白质含量/(mg/100g)
鸡蛋	12.7	鱼片干	46.1	海米	43.7
墨鱼(干)	65.3	豆腐皮	44.6	蹄筋(猪,牛)	35.2
腐竹	44.6	南瓜子(炒)	36.0	西瓜子	32.7
黑豆	36.1	酱驴肉	33.7	紫菜	26.7
黄豆	35.1	扒鸡	29.6	杏仁	24 7
酱牛肉	31.4	猪肝	26.4	叉烧肉	23.8
电烤羊肉串	26.4	蚕豆	24.6		
花生仁	24.1	牛肉干	45.6		

表 1－4　　维生素 A 的主要食物来源

食物名称	视黄醇当量/(μg/100g)	食物名称	视黄醇当量/(μg/100g)	食物名称	视黄醇当量/(μg/100g)
羊肝	20972	蛋黄	438	鱼肉	212
猪肝	4972	鸭蛋	261	五花肉	114
鸡蛋	310	小红肠	158	强化维生素A,D奶	66
红鳟鱼	206	鸡翅	68		
驴肉(瘦)	72	河虾	48	鸡腿	44
鲳鱼	50	海带(干)	40	北京烤鸭	36
青鱼	42	鸡肝	10414		
牛肝	20220	鹌鹑蛋	337		

表 1－5　　维生素 B_1 的主要食物来源

食物名称	维生素 B_1 含量/(mg/100g)	食物名称	维生素 B_1 含量/(mg/100g)	食物名称	维生素 B_1 含量/(mg/100g)
葵花子仁	1.89	里脊	0.47	标准粉切面	0.35
花生仁(生)	0.72	猪大排	0.8	黄豆	0 43
蛋清肠	0.65	叉烧肉	0.66	白芝麻	0.36
香肠	0.48	豌豆(干)	0.49	玉米面	0.34
腊肉	0.9	绿豆面	0.45	松子(生)	0.41
黑芝麻	0.66	大麦	0.43	葵花子(生)	0.36
猪肉(瘦)	0.54	蚕豆	0.37	黑米	0.33

表 1-6 维生素 B_2 的主要食物来源

食物名称	维生素 B_2 含量/(mg/100g)	食物名称	维生素 B_2 含量/(mg/100g)	食物名称	维生素 B_2 含量/(mg/100g)
大红菇	6.90	黄鳝	2.08	猪肝	2.08
香菇(鲜)	2.00	羊肾	1.78	羊肝	1.75
牛肝	1.30	杏仁	1.25	鸡肝	1.10
鸭肝	1.10	桂圆肉	1.03	紫菜	1.02
奶酪	0.91	苜蓿	0.73	鸭蛋黄	0.62
鹌鹑蛋	0.49	猪心	0.48	豆瓣酱	0.46
黑木耳	0.44	火腿肠	0.43	桂圆干	0.39

表 1-7 维生素 C 的主要食物来源

食物名称	维生素 C 含量/(mg/100g)	食物名称	维生素 C 含量/(mg/100g)	食物名称	维生素 C 含量/(mg/100g)
鲜枣	243	红小辣椒	144	苜蓿	118
芥蓝	76	柿子椒	72	猕猴桃	62
菜花	61	苦瓜	56	西兰花	51
香菜	48	草莓	47	藕	44
桂圆(鲜)	43	圆白菜	40	油菜	40
蒜苗	35	橙子	33	菠菜	32
柿子	30	土豆	27	杏仁	26

表 1-8 维生素 E 的主要食物来源

食物名称	维生素 E 含量/(mg/100g)	食物名称	维生素 E 含量/(mg/100g)	食物名称	维生素 E 含量/(mg/100g)
胡麻油	399.9	羊肝	29.93	发菜	21.70
鹅蛋黄	95.7	葵花子(炒)	26.46	葵花子仁	79.09
豆油	93.08	棉子油	86.45	菜子油	60.89
辣椒油	87.24	山核桃	65.55	花生油	42.06
香油	68.53	核桃(干)	43.21	松子	34.47
黑芝麻	50.40	芝麻油	35.09	南瓜子	27.28
豆豉	40.69	腐竹	27.84	猪油	21.83

表 1-9 钙的主要食物来源

食物名称	钙含量/(mg/100g)	食物名称	钙含量/(mg/100g)	食物名称	钙含量/(mg/100g)
芝麻酱	1170.0	虾皮	991	黑芝麻	780
苜蓿	713	芥末	656	海米	555
铁观音	416	河虾	325	豆腐干	328
腐乳	302	泥鳅	299	香干	299
花生仁(炒)	284	黑木耳	247	蟹肉	231
雪里蕻	230	黑豆	224	沙丁鱼	184
熏干	173	酸奶	161	牛奶	117

表 1-10　　锌的主要食物来源

食物名称	锌含量/(mg/100g)	食物名称	锌含量/(mg/100g)	食物名称	锌含量/(mg/100g)
生蚝	71.2	海蛎肉	47.05	马肉	12.36
鲜扇贝	11.69	羊肉	10.42	墨鱼	10.02
牡蛎	9.39	松子(生)	9.02	香菇(干)	8.57
蚌肉	8.50	花生油	8.48	干红辣椒	8.21
酱牛肉	7.12	南瓜子(炒)	7.12	山核桃(干)	6.42
黑芝麻	6.13	羊肉(瘦)	6.06	葵花子(炒)	5.91
猪肝	5.78	芝麻(白)	4.21	芝麻酱	4.01

表 1-11　　铁的主要食物来源

食物名称	铁含量/(mg/100g)	食物名称	铁含量/(mg/100g)	食物名称	铁含量/(mg/100g)
苔菜	283.7	珍珠白蘑	189.9	杏丁蘑	213.2
黑枣	102	发菜	99.3	黑木耳	97.4
紫菜	54.9	蚌肉	50.0	豆腐皮	30.8
鸭血	30.5	鸡血	25.0	鸭肝	23.1
黑芝麻	22.7	猪肝	22.6	田螺	19.7
竹笋	18.90	芥末	17.2	腐竹	16.5
豆瓣酱	16.4	鸡肝	12.0	酱豆腐	11.5

二、食品和营养素的标识

食品营养标签是许多国家非常重视的一个方面。它包括：营养成分、营养信息或营养声明、健康声明，它是显示食品组成成分、食品的特征和性能，向消费者传递食品营养信息的主要手段，也是向公众进行营养教育，指导选择健康膳食的一个指南。近年来，随着市场经济的发展和商品流通的日益国际化，食品营养标签的内容和形式在进行公平交易；引导、促进消费、保护消费者的权益和身体健康中占有越来越重要的地位。食品营养标签的立法和管理工作是国际组织和许多国家重要的立法工作之一，目前除了国际食品法规委员会(CAC)为指导和协调而制定的一系列文件外，美国、澳大利亚、新西兰、加拿大等发达国家和欧盟都有自己的营养标签标准或法规。有的国家或地区虽没有特定的营养标签的标准或法规，但是食品标签法或相关的营养法规中规定了“食品营养标签”标示和宣传用语的内容，如日本等国家及中国香港、台湾等地区。营养标签的制定和实施已成为国际发展趋势，也标志着食品工业现代化和人类的文明进步。我国的食品营养标签标准的工作目前正在进行中，这项工作的实施将对今后的营养素测定分析工作给予极大的推动。

(一) 国际法典委员会(CAC)有关营养标签的主要指导原则

从1979以来，国际法规委员会（CAC）在有关营养标签方面的法规共8个，包括1979年制定1991年修订的《声明通用指导原则》，1985年制定1991年修订的《预包装食品标签通用标准》，1985年制定的《特殊用途预包装食品标签和声明的通用标准》，1981年制定的《食品添加剂通用标准》，1985年制定1993年修订的《营养标签通用指南》，1995年《健康和营养声明应用指导草案》，1997年《营养声明应用指南》和《"清真"食品一词应用的指导原则》。这些法规是指导和协调世界各国营养标签法规的指导性文件，对促进国际贸易发展有着重要作用。总结CAC的有关营养标签的主要宗旨和原则，有如下几点：

1. 使用范围

CAC的营养标签使用于所有食物，当有营养信息或声明时，营养标签为强制性的。

2. 营养标签（nutrition labeling）

营养标签最初的概念是生产者和买者，卖者和消费者之间沟通的一个渠道。营养标签由两部分组成：

（1）营养素描述（nutrient declaration）：一个标准的营养素的含量表，用100g或100mL的食品中所含有的能量、蛋白质、脂肪和有价值的碳水化合物表示；当有营养声明时，所涉及的营养素或成分必须标示其含量。

（2）其他营养信息（supplement nutrition information）其他营养信息指增加对营养素标示的解释，增加消费者对食物营养价值理解。包括营养声明、健康声明和其他方式。

3. 声明（claim）

禁止使用无科学根据、易产生误解的和意思不明确的声明，如某食品可用于预防和治疗疾病或缓解疾病症状；某食品是全部营养素的适宜来源；某食品是促进健康的、完好的或卫生的等等。允许声明的内容主要分为营养声明、健康声明。

（1）营养声明（nutrition claim）表示来自食物本身具有的营养特性和效应，包括但不限于能量和蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素和矿物质。三种形式的声明如：

① 营养素含量声明，即描述食物中营养素含量的水平，如xx食品是钙的良好来源；xx食品为高膳食纤维和低脂肪等。

② 比较声明，即两个或多个食品比较营养素或能量水平。如减少了……，提高了……，或富含……。

③ 营养功能声明，即描述营养素在生长发育、身体功能方面的生理作用。如钙强壮骨骼和牙齿，铁是红细胞生成的必要因子等。

（2）健康声明（health claim）健康声明是指食品或食品中的营养素或其他物质与疾病或健康有关条件的关系的一种状态、建议和效应。包括三个方面：

① 食品或食品中的营养素或其他物质对身体健康的影响，如鱼油降低血清甘油三酯水平，膳食纤维可降低血清胆固醇。

② 食品或食品中的营养素或其他物质在预防疾病上的作用，如富含膳食纤维可降低冠心病的危险。

③ 膳食与预防疾病和健康有关条件，如低脂膳食可减少癌症，xx 是低脂食物。

1997 年，正式发布的《营养声明应用指南》中，健康声明部分未有规定和说明。

(3) 有关膳食指南和健康膳食的声明(dietary guidelines or healthy diets)根据 CAC 的营养标签指导原则，美国 1991 年实行的营养标签行动(见附录五)，规定了不同食品的营养素强制性标示的内容。此项举措，使美国 90% 的居民脂肪摄入量下降，相关疾病的发生率(如心脏病、乳腺癌等)也降低了 5%。

(二) 国内有关标准和食品营养素标识的现状

我国涉及食品标签的内容主要有国家技术监督局 1995 年发布的 GB7718—94《食品标签通用标准》和 1992 年发布的 GB13432—92《特殊营养食品标签》两项，另外在卫生部 1993 年发布的《食品添加剂卫生管理办法》、1994 年 GB14880—94《食品营养强化剂使用卫生标准》和 1996 年发布的《保健食品管理办法》、国家监督局颁发的 GB10771—89《婴幼儿强化食品、钙强化饼干规定》中，也涉及了标签中营养成分的部分内容。但基于各个标准并非以食品营养内容为主，所以对营养成分标示、营养声明均没有具体的定义和要求(如图食品标签示例)。

示例：

食品名称	消毒牛奶
净含量	250mL(±3%)
制造者名称	北京市牛奶公司右安门乳品厂
地址	北京市丰台区右安门外北甲地
生产日期	1994 年 2 月 15 日
保存期	2 天
贮藏指南	2～10℃
产品标准号	GB 5406

目前不同食品的营养素标签应该标注那些内容，量词应该如何规定如“高钙”、“无/低糖”、“低/脱脂”、“多维”等，国内尚无统一定义。但是目前我们常见包装食品应至少具有以下特征：

① 营养功能，即提供人体所需的多种营养素。

② 感官能满足人们不同的嗜好和要求。

③ 安全卫生，但我国现行的食品标签标准涉及营养标示的内容还较少。

1. 保健食品

目前国内外风行的 health food, functional food 都是我们所说的保健食品。

虽然各国还没有统一的定义、称谓和范围,但其基本的含义是一致的。随着1996年卫生部保健食品管理办法的出台,中国食品和药品管理史上带来了重大变革,从此明确的将食品、保健食品、药品加以区分和定义。即像保健食品管理办法中指出的一样:保健食品是指具有特定的保健功能的食品。适宜于特定人群食用,具有调节机体功能,不以治疗疾病为目的的食品。

保健食品必须符合4个要求:

(1) 经必要的动物和/或人群功能试验,证明其具有明确、稳定的保健作用。

(2) 各种原料及其产品必须符合食品卫生要求,对人体不产生任何急性、亚急性或慢性危害。

(3) 配方的组成及用量必须具有科学依据,具有明确的功效成分。如在现有技术条件下不能明确功效成分,应确定与保健功能有关的主要原料名称。

(4) 标签、说明书及广告不得宣传疗效作用。

以上条件对于产品分析提出明确要求,因此保健食品中功效成分需要明确,含量需要清楚。对产品质量和功能确定提供可靠保证。

2. 特殊营养食品

特殊营养食品指通过改变食品天然营养素的成分和含量比例,以适应某些特殊人群营养需要的食品。它包括婴幼儿食品、营养强化食品、调整营养素食品(低糖、低钠、低谷类蛋白)。这些产品常常是营养素标示最完全的包装产品。

营养素补充剂,单纯以一种或数种经化学合成或天然动植物中提取营养素为原料加工制成的食品,他们不一定是由食物为载体,但通常补充剂量是RDA的1/3~2/3,水溶性的维生素可达到100% RDA。营养素补充剂现仍在保健食品的管理范围之内,目前国家卫生部正在制订有关营养素补充剂管理办法,今后有不申明保健作用的营养素补充剂,有从保健食品中划分而单独管理的可能。营养素补充剂中营养素的含量标示是必须的(请参考附录食品营养强化范围参考)。

3. 新资源食品

新资源食品是指在我国新研制、新发现、新引进的无食用习惯或仅在个别地区有食用习惯的,符合食品基本要求的物品。新资源食品包括食品的原料及用其生产的成品。这里指的食品基本要求即是营养和安全。

4. 绿色食品

绿色食品是遵循可持续发展原则,按照特定生产方式生产,经专门机构认定,许可使用绿色食品标签的无污染的安全、优质、营养类食品。

由于绿色食品的特殊含义,所以其标准也相对更加严格。它由以下6个部分构成:

(1) 绿色食品产地的环境标准,即《绿色食品产地环境质量标准》。包括环

境空气质量标准、农田灌溉水质标准、渔业水质标准、畜禽养殖用水标准和土壤环境质量标准等。

(2) 绿色食品生产技术标准。它是绿色食品标准体系的核心，包括绿色食品生产资料使用准则和绿色食品生产操作规程两部分。

(3) 绿色食品产品标准。该标准是衡量绿色食品最终产品质量的指标尺度。它的卫生品质要求高于国家现行标准，主要表现在对农药残留和重金属的检测项目种类多、指标严。反映了绿色食品生产、管理和质量控制的先进水平，突出了绿色食品产品无污染、安全的卫生品质。

(4) 绿色食品包装和标签标准。包括包装材料以及产品包装从原料、产品制造、使用、回收和废弃的整个过程都应符合环境保护的要求；绿色食品产品标签，除符合国家《食品标签通用标准》的要求外，还要符合《中国绿色食品商标设计使用规范手册》的要求。

(5) 绿色食品贮藏、运输标准。对绿色食品贮运的条件、方法、时间做出规定。以保证绿色食品在贮运过程中不遭受污染、不改变品质，并有利于环保和节能。

(6) 其他相关标准。包括《绿色食品推荐肥料标准》、《绿色食品推荐农药标准》、《绿色食品推荐食品添加剂标准》和《绿色食品生产基地标准》等等。此项标准不是绿色食品质量控制必需标准，而是一项促进质量控制管理工作的辅助性标准。

绿色食品的分析更加注重其食品卫生的内容，但也有重视营养成分的趋势。

5. 转基因食品

转基因食品是指通过生物技术的手段获得各种符合人类需要的植物品种，其中以农作物占多数。在最初的阶段，多数转基因食物主要是抗虫、抗旱或提高产量等环境胁迫的抗性基因产品，但最近的转基因产物多在营养改造方面，如高支链淀粉的土豆、高赖氨酸含量的小麦、胡萝卜素含量丰富的番茄等等。转基因食品是通过操作种子的蛋白基因，用转基因手段产生的新食物产品。目前，对转基因食物的安全评价还缺乏一定的规范，其中与营养相关的问题是其与传统食物成分的等同性和稳定性评价。

第三节 食物和营养需要

一、中国居民膳食营养素参考摄入量(DRIs)

为了保持人体健康及维持各种生命活动，人类必须每天从膳食中摄取各种各样的营养物质。人体对某种营养素的需要量会随年龄、性别和生理状况而异。成年人需要营养素来维持体重及保障机体功能；儿童、青少年除了维持机体功能



外，还需要更多营养素来满足生长发育的需要；妊娠和哺乳妇女需要额外的营养素，以保证胎儿及母体组织增长和泌乳的需要。

为了帮助个体和人群安全地摄入各种营养素，避免可能产生的营养缺乏或营养过多的危害，营养学家根据国内外有关营养素需要量的知识，提出了适用于我国各类人群的膳食营养素参考摄入量(DRIs)。表 1－12 至表 1－15 列出的

表 1－12　　能量和蛋白质的 RNIs 及脂肪供能比

年龄/岁	能量#				蛋白质		脂肪
	RNI/MJ		RNI/kcal		RNI/g		占能量百分比
	男	女	男	女	男 M	女 F	/%
0～	0.4MJ/kg		95kcal/kg*		1.5～3g/kg		45～50
0.5～							35～40
1～	4.60	4.40	1100	1050	35	35	
2～	5.02	4.81	1200	1150	40	40	30～35
3～	5.64	5.43	1350	1300	45	45	
4～	6.06	5.83	1450	1400	50	50	
5～	6.70	6.27	1600	1500	55	55	
6～	7.10	6.67	1700	1600	55	55	
7～	7.53	7.10	1800	1700	60	60	25～30
8～	7.94	7.53	1900	1800	65	65	
9～	8.36	7.94	2000	1900	65	65	
10～	8.80	8.36	2100	2000	70	65	
11～	10.04	9.20	2400	2200	75	75	
14～	12.00	9.62	2900	2400	85	80	25～30
18～							20～30
体力活动水平 PAL^							
轻	10.03	8.80	2400	2100	75	65	
中	11.29	9.62	2700	2300	80	70	
重	13.38	11.30	3200	2700	90	80	
孕妇		+0.84		+200		+5，+15，+20	
乳母		+2.09		+500		+20	
50～							20～30
体力活动水平 PAL^							
轻	9.62	8.00	2300	1900			
中	10.87	8.36	2600	2000			
重	13.00	9.20	3100	2200			
60～					75	65	20～30
体力活动水平 PAL^							
轻	7.94	7.53	1900	1800			
中	9.20	8.36	2200	2000			
70～					75	65	20～30
体力活动水平 PAL^							
轻	7.94	7.10	1900	1700			
中	8.80	8.00	2100	1900			
80～	7.74	7.10	1900	1700	75	65	20～30

各年龄组的能量的 RNI 值与其 EAR 值相同。
*为 AI 值，非母乳喂养应增加 20%。
^ PAL 为体力活动水平。
(凡表中数字缺如之处表示未制定该参考值)

表 1－13 常量和微量元素的 RNIs 或 AIs

年龄/岁	钙	磷	钾	钠	镁	铁		碘	锌		硒	铜	氟	铬	锰	钼
	AI	AI	AI	AI	AI	AI		RNI	RNI		RNI	AI	AI	AI	AI	AI
	/mg	/mg	/mg	/mg	/mg	/mg		/μg	/mg		/μg	/mg	/mg	/μg	/mg	/μg
0～	300	150	500	200	30	0.3		50	1.5		15(AI)	0.4	0.1	10		
0.5～	400	300	700	500	70	10		50	8.0		20(AI)	0.6	0.4	15		
1～	600	450	1000	650	100	12		50	9.5		20	0.8	0.6	20		15
4～	800	500	1500	900	150	12		90	12.0		25	1.0	0.8	30		20
7～	800	700	1500	1000	250	12		90	13.5		35	1.2	1.0	30		30
						男M	女F		男M	女F						
11～	1000	1000	1500	1200	350	16	18	120	18.0	15.0	45	1.8	1.2	40		50
14～	1000	1000	2000	1800	350	20	25	150	19.0	15.5	50	2.0	1.4	40		50
18～	800	700	2000	2200	350	15	20	150	15.0	11.5	50	2.0	1.5	50	3.5	60
50～	1000	700	2000	2200	350	15		150	11.5		50	2.0	1.5	50	3.5	60
孕妇																
早期	800	700	2500	2200	400	15		200	11.5		50					
中期	1000	700	2500	2200	400	25		200	16.5		50					
晚期	1200	700	2500	2200	400	35		200	16.5		50					
乳母	1200	700	2500	2200	400	25		200	21.5		65					

（凡表中数字缺如之处表示未制定该参考值）

表 1－14　　脂溶性和水溶性维生素的 RNIs 或 AIs

年龄/岁	维生素A RNI /μgRE		维生素D RNI /μg	维生素E AI /mgα-TE*	维生素B_1 RNI /mg		维生素B_2 RNI /mg		维生素B_6 AI /mg	维生素B_{12} AI /μg	维生素C RNI /mg	泛酸 AI /mg	叶酸 RNI /μgDFE	烟酸 RNI /mgNE		胆碱 AI /mg	生物素 AI /μg
0～	400(AI)		10	3	0.2(AI)		0.4(AI)		0.1	0.4	40	1.7	65(AI)	2(AI)		100	5
0.5～	400(AI)		10	3	0 3(AI)		0.5(AI)		0.3	0.5	50	1.8	80(AI)	3(AI)		150	6
1～	500		10	4	0.6		0.6		0.5	0.9	60	2.0	150	6		200	8
4～	600		10	5	0.7		0.7		0 6	1.2	70	3.0	200	7		250	12
7～	700		10	7	0.9		1.0		0 7	1.2	80	4.0	200	9		300	16
11～	700		5	10	1.2		1.2		0.9	1.8	90	5.0	300	12		350	20
	男M	女F			男M	女F	男M	女F						男M	女F		
14～	800	700	5	14	1.5	1.2	1.5	1.2	1.1	2.4	100	5.0	400	15	12	450	25
18～	800	700	5	14	1.4	1.3	1.4	1.2	1.2	2.4	100	5.0	400	14	13	450	30
50～	800	700	10	14	1.3		1.4		1.5	2.4	100	5.0	400	13		450	30
孕妇							1 7										
早期	800		5	14	1.5		1.7		1.9	2.6	100	6.0	600	15		500	30
中期	900		10	14	1.5		1.7		1.9	2.6	130	6.0	600	15		500	30
晚期	900		10	14	1.5		1.7		1.9	2.6	130	6.0	600	15		500	30
乳母	1200		10	14	1.8		1.7		1.9	2.8	130	7.0	500	18		500	35

* α－TE＝α　生育酚当量

（凡表中数字缺如之处表示未制定该参考值）

是中国营养学会2000年10月制定的我国居民膳食营养素参考摄入量(RDIs)。

这些营养素的DRIs是保健食品、特殊营养食品、强化食品的强化量的依据,一般而言强化营养素在推荐摄入量(RNI)或适宜摄入量(AI)的1/3～2/3之间。这也是我们分析测定食物时的参考。

二、维生素与矿物质功效常识

正常人体需要的各种营养素都需从饮食中获得,如果某种营养素长期供给不足或过多就可能产生相应的营养不足或营养过多的危害。表1-15列出了常见维生素和微量元素的基本生理功能。

表1-15 维生素与矿物质功效常识

营养素类	效能
维生素类	
维生素A	促进成长,强壮骨骼,防治眼疾,帮助呼吸系统抵抗感染
维生素 B_1	参与神经系统代谢,促进智力发展,促进生长发育,帮助消化,保持精力充沛
维生素 B_2	参与神经系统代谢,促进智力发展,促进细胞再生,促进皮肤毛发、指甲生长,增进视力,减轻眼睛疲劳,帮助消除口腔炎症,帮助糖、脂肪、蛋白代谢
维生素 B_6	帮助消化吸收蛋白质、脂肪,促进核酸合成,防止衰老,防止神经、皮肤系统疾病
维生素 B_{12}	防止贫血,促进儿童成长,增进体力,增进记忆力,消除烦躁不安
维生素C	治疗牙出血,加速手术后恢复,降低胆固醇,预防病毒细菌感染,预防治疗感冒,预防坏血病,延长蛋白质细胞寿命
维生素D	帮助吸收和利用钙质,强化骨骼牙齿
维生素E	延缓细胞衰老,保持青春容颜,提供体内供氧,增加耐久力,减轻疲劳,降低血压,防止流产
叶酸	促进泌乳,健美皮肤,防止白发,增进食欲,防治口腔溃疡
烟酸	促进消化,防治偏头疼,降血压,防治口臭,降低胆固醇
牛磺酸	促进儿童成长发育,增强免疫,抗菌消炎,消除疲劳
生物素	防治白发、秃头,缓和肌肉痛楚,辅助湿疹皮炎的治疗
泛酸	帮助伤口愈合,参与制造抗体,抵抗传染病,抗疲劳
矿物质类	
铁	运输氧与电子转移,促进生长发育,防治缺铁性贫血,增加疾病抵抗力,增强学习能力
锌	促进食欲,促进生长发育,防治皮肤疾病,促进青少年正常性发育,促进能量代谢,促进基因转录
碘	组成甲状腺素的合成,促进生长发育,防治呆小病
硒	组成谷胱甘肽过氧化酶,防止克山病和大骨节病,促进生长
氟	构成骨骼牙齿成分,降低龋齿患病率,防止骨质疏松,促进生长
铜	组成氧化酶,参与铁的转运和结缔组织形成,防止贫血和大血管破裂
钼	是氧化酶的组成成分,促进生长,防止难产
钴	组成维生素 B_{12},防止贫血,促进动物生长

续表

营养素类	效　　　能
锰	是许多酶的激活剂，与DNA、RNA、蛋白质的合成有关，促进生长、骨骼发育
铬	构成葡萄糖耐量因子，维持糖耐量正常
硅	与黏多糖合成有关，促进生长，维持骨骼正常
钒	促进生长，促进骨骼生长和生殖机能发育
镍	与铁的吸收相互作用，防止贫血，促进生长；维护肝脏功能和生殖功能
锡	促进蛋白质与核酸反应，加速动物生长

第二章　食物分析基础知识

一、样品的采集与试样的制备

在食物分析工作中，因为被检定的物品差异很大，所以取样技术是很重要的。不但每种材料因品种、土壤、气候、栽培、收获、加工、贮藏的情况各有不同，而且即使在同一的材料中这一部分与那一部分也有差别。例如：在同一果园中，不同品种的苹果，维生素含量不同；同一品种，在不同地区或不同气候条件下栽培，维生素含量亦有差别；在同一棵树上的苹果，亦因成熟程度或生长位置的向阳向阴，维生素含量也有所不同；在一个苹果里，靠近外皮或靠近核心的部分，维生素含量不相同，采样时不估计到这些情况，则所得的分析结果就会没有代表性，甚至得出错误结论。因此，做分析工作的人必须认识并且重视这一点，从而计划如何采取样品，使因此引起的误差减到最低限度。

差异性的大小，视成品的性质及选择的情况而定。例如，要测定每一类物品的营养素平均含量（如所有种样的西红柿、小麦、猪肉等），则引起差异的因素很多，假如把范围缩小到某一品种，则若干引起差异的因素即行消失。再把范围缩小到某一地区，或某一成熟时期，则引起差异的因素将更为减少。又如要研究加工对维生素含量影响，有一些引起差异的因素是可以从原料的选择方面减少的，但其他因素的变化（如温度、氧气、光线等）则更为重要。在食物贮藏的研究中，还需把另外一些因素考虑进去。为了得到我们所要求的正确结果，以上这些条件是必须注意的。

除去以上所说的样品本身的差异之外，有些是因为分析技术操作上引起的差异，即所谓方法上的误差。在实际工作中这两方面的差异都有，它们同时影响着分析结果。因此弄清分析方法所引起的误差后，始能估计其他因素对于分析结果所引起的误差。

（一）概论

"取样"是从一大批物品中取出一部分以代表全部的样品。这里所指的全部，可能是物品某一部分的全部，例如橘子皮的全部是整个橘子的一部分，物品的差异性愈大，则采取代表性样品的操作手续愈复杂。虽然取样方法随不同的物品而异，但一般说来可随物品的形态分为如下两类。

1. 均匀的物品

单相的液体或是搅拌均匀的粉末是这类物品最简单的例子，因为每一小部分的成分与其全部成分相同，任何一部分均可用作分析的样品，但是必须注意，有些物品从表面上看是均匀的，但实际上则未必十分均匀，体积很大的时候尤其是如此。照例，一种溶液或是粉末状固体，在临采样之前，也必须混合均匀。

混合小量的粉末或溶液，可在至少大于全部样品一倍以上的容器里旋转振荡，或是从一个容器倒入另一个容器中，反复数次。大量的溶液在大的容器中有时可用搅拌器搅匀。必须注意，有些易被氧化的东西在搅拌时要避免与空气混合，凡不可能搅拌的东西，必须用几何法取样。

粉末或研碎的东西，又可以用四分法取样。此法的操作程序如下：

将粉末置于一大张方形纸或漆布、帆布、橡皮布上，然后使粉末反复移动，即提起纸的一角，使粉末流向对角，随即提起对角粉末流回，如法将四角反复提起使粉末反复移动，然后将粉末铺平，用药铲、刀子或其他适当器具，从当中划一"＋"字，将样品分为四瓣。除去对角两瓣，将剩余两瓣如前法混合后再分瓣。重复以上操作步骤，直至剩余者与所需样品相近为止。

大量的粉末（或谷物）也可在洁净的地板上堆成锥形，然后用铲将堆移至另一处，移动时将每一铲倒入前一铲之上，则粉末由顶端向下流至周围，如此反复将堆移动数次，即可混合均匀。

2. 不均匀的物品

此类物品需要比较复杂的取样技术，其复杂程度视物品体积之大小和内部存在的，可引起差异的因素之多寡而定，采取代表样品惟一可靠的方法是把全部物品磨碎至相当程度，使能混合接近均匀。虽然这种方法往往不尽切合实际，但任何其他办法也只是根据实用与准确度的要求所采取的折中的办法，在这种情形之下，所用的采样技术应根据以下几点考虑：

（1）可能达到的或要求达到的准确度。

（2）全部物品的均匀程度。

（3）时间、人力、物力的范围。

（4）分析的目的。

凡大量的不均匀样品，譬如一车粮食或一车饲料，其分析样品在运往实验室之前，往往首先采取多量样品，然后由取出的样品中重复取样多次，得出一连串逐渐减少的样品，可称做初级、次级、三级……样品，分析用的样品可从最末一级样品中制备。为了使每一级样品都能代表全部物品，所采用的取样方法称为"几何法"。现将此法详述如下：

所谓"几何法"是把整个一堆物品看成为一种有规则的几何立体（立方形、圆柱形、圆锥形等等）。取样时首先把这个立体分为若干体积相等的部分（虽然不

便实际上操作，但至少可以在想像中把它分开），这些部分必须在全体中分布得均匀，即不只在表面或只是在一面。从这些部分中取出体积相等的样品，这些部分的样品称为支样，再把这些支样混合即得初级样品。

现在多种法定取样手续都以这种取样方法为根据，当对一种样品的性质一无所知时，必须用这样方法采取样品。

如果全部物品是由来源不同的几批物品组成的，譬如一车饲料是由不同工厂用同一配方制造的或是在一个工厂分批在几天之内制造的，则可从每一批中用几何法取样，再分别混合称为分批样。然后从各分批样品中按各批数量的比例取出样品，把这些混合起来，就成为全部的初级代表样品。例如：一批样品的初级样品全部共重 454kg(100 lb)，是由 3 个不同质量的分批组成的，分批的质量是 11.4、15.9、18.2kg(25、35 lb 和 40 lb)，这整批物品的初级样品应该是从以上分批中取出 25、35、40g 混合而成。不过，从大量的物品中取样须给一定的手续或使用一定器具，详细步骤可从各专门参考文献中查阅。除非初级样品已经是液体，或是很细的固体粉末，取样时一定要经过某种粉碎手续使之便于混合。干的物品可用各种磨来碾碎，少量样品可用乳钵研碎，湿的物品可用刀铲切碎，或用其他方法，如用绞肉机绞碎，用搅碎机搅碎或在乳钵中用干净的硬沙子研磨等都可。

在以上所有的操作过程中，必须注意防止水分的损失，如有损失，应予补足。意外损失的汁液，不但对于维生素的总含量有影响，而且对于样品中维生素的浓度也有影响，因为汁液与其中一些固体中维生素的分布不一定均匀。在有些情况下，应特别注意减少酶或某些接触剂的影响，避免把样品暴露在空气中（如维生素 A、胡萝卜素、维生素 C 等）或阳光下（维生素 A、核黄素、吡哆醇等）。

粉碎之后（如能则在粉碎之前，将初级样品混合均匀，取出次级样品，再混合均匀，并在最适宜保存维生素的情况下保存）尽可能从速进行分析。假如不可能立刻分析，对容易腐烂的样品应用脱水、冷冻或加入适当药剂的方法保存之。

次级样品或运送到试验室来的样品的数量往往比实际分析所需要的大得多。因此这已经混合均匀的样品只要一小部分就足够分析之用，有时也需要把送来的全部样品再用搅碎机或类似的工具混合一次。有时需要加入一些液体把样品打成很均匀的稀糊。如果这样做，必须把所用的原来样品的量和所加入液体的量详细记录以便于计算结果。

必须注意，在工厂中担任采取初级样品的人，常常不是在化验室工作的，对于化验和采样的意义不能体会。因此必须教给他们一定的方法，给予严格的训练，并随时加以检查。采样人如果不经过训练，则样品的代表性便不可靠，分析结果便毫无意义。

（二）取样方法在各种类型物品上的应用

1. 肉类及其他动物组织

（1）新鲜：冷藏与腌制肉类。动物组织中的维生素含量，随动物种类、品种和饲料等情况而有不同。在同一动物的身体中，各器官的含量又不同，甚至于不同部位的肌肉中的含量也不一样。因此，要求得一只动物或几只动物全部身体所含维生素的平均量是没有一个简单方法可以适用的。当从不同部位的肉混合制成的一批样品中，或由好些只动物的同一部位的肉混合而成的一批样品中，取分析样品时，可从整个一批中取出百分之几，也可从每一大块上取下一部分。在从每一大块上切下一小块时应从不同的部位切，如此可以避免每一次切下的都是同一部位。

从各器官或各部位取下来的支样，可以个别分析，也可以把这些支样混合起来分析，这要看分析的目的和要求而定。

有时需要研究某一块肌肉经过某种手续处理后的维生素含量的变化（譬如烹调）。在这一类工作中的取样方法，是从一块肌肉的中心切下相邻的两片横断面，用一片做处理前的分析，另一片做处理后分析。如果必须保全一块样品的整体而不把它切断，则此 2 份样品可以从一只动物身体的这边切一片，从另一边对称的部位再取一片。屡次分析的结果证明，用这种取样是靠得住的，背长肌与大腿二头肌两部分的肌肉比较大，其维生素含量的分布也相当均匀，最适宜做此类研究。

假如处理方法中有外加物质会影响整个成分时（譬如加盐或有大量水分的损失等），必须在计算结果时加以校正。假如没有蛋白质的损失，则维生素可用每 1g 蛋白质为单位来表示。另一个方法是拿处理前后的维生素总量来做比较，即以处理前的维生素含量乘处理前样品的总质量来相比。如果在处理手续中有汁液分出，则汁液的体积和维生素的含量都必须测定，并计算在检测结果之内。

因肉的差异性大，初级样品往往很大（2.5～5kg），所以制备次级样品的第一步，是用搅肉机把初级样品全部搅碎并混合均匀。方法是取 100g（用几何法）置于打碎机中，加水（或其他提取液如缓冲剂或 0.1mol/L 盐酸等）打匀成糊状，然后从其中取出次级样品或分析样品。

以上方法虽适用于新鲜肉类，但冻肉经低温（40～50℃）解冻后也可用同样方法处理。腌制亦可用同样方法处理。在腌制过程中，每一块肉中各部分的维生素含量有散布均匀的可能。用盐水腌制的肉也可借液体的传导使整批肉的维生素含量变为均匀，而水溶性的维生素则可能从肉中渗入腌制液之内。这些情形也都应该估计到。

（2）罐头肉：许多罐头里的肉装得很紧，热传导很慢，用蒸汽消毒所需时间往往很长，于是靠近外面的肉受热时间要比中心部分长得很多。因此，不耐热的

维生素含量在罐的半径的不同部分上亦有所不同,这种差异性显然是随罐子的大小而不同。因此,惟一准确的取样方法是把整个罐头里的肉全部磨碎混合,再从其中取出一部分样品来做分析。

新鲜肉彼此之间的差异情况,在罐头肉中也同样存在,不仅一个罐头之内的肉有差异,而且罐与罐之间的差异更大。这种差异又可因消毒过程中热的分布不同,而使不耐热的维生素的损失程度发生差别。

由于各厂家所用的消毒温度与时间不同,所以不同厂家所制造的同类食物的维生素含量也不同。各批的物品之间有差别,各种不同大小的罐头之间也有差别。罐头贮藏时间之长短与温度的高低也影响一些容易损失的维生素含量。对于这些情况,在采取初级样品时也必须考虑周到。

(3) 干肉:脱水肉的取样没有什么特殊问题。可以把支样混合磨碎,取出一部分,直接提取或最好加适量的水,使干肉复原后打碎再提取。

(4) 鲜鱼类:将鱼洗净,除去鳞、鳍、内脏和头尾。对鱼体长小于 15cm 的小型鱼取 5~10 条,大型鱼取样不小于 3 条。自每条鱼横断面切取 3 块厚度为 2.5cm 的鱼片,一片取自背上胸鳍部位,一片取自胸鳍与肛门之间,一片取自肛门部位。将切下的鱼片放在蒸锅内蒸熟以灭去硫胺素酶的活性,同时也便于除去骨刺,采取鱼肉样品。

2. 谷类与谷类制品

(1) 全谷粒:为测定维生素用的全谷样品,在采集时,无特殊困难,近似分析用的采样方法,便可适用。一般皆用几何法,最后将 500g 的样品磨成粉状,再称出一部分为提取之用。

(2) 面粉与混合面:此类制成品已相当均匀,用几何法、二分法或四分法采取便可。

(3) 面粉制品:馒头、面包、窝头、丝糕、烙饼等样品的采集,可先取若干单位。例如馒头 10 个,切取每单位的 1/2 或 1/4,切碎混合,再按四分法抽取。面包皮与内部的水分及其他成分可能有较大差异,取样时应注意各部分量的比例。面条从汤中捞出后,应放置在盘上数分钟,除去外部流动的汤水,再切碎混合取样。如欲分别测定面条与汤中的含量,应分别将面条全部与汤称重,然后取样分析,以便推算结果。

(4) 米制品:焖锅饭的上层与底层,成分可能有差别,所以取样时应先将全锅混匀或者用对角取样。碗蒸饭,每一碗的水分可能有差别,应由若干碗混合后取样。蒸饭如不计汤中的损失,取样时无特别注意之点;如欲分别测定饭与汤中的维生素含量,则应将饭与汤分别称重,然后取样,以便推算结果。

在调查一个炊事单位的情况时,最好能在不同餐次分别取样共取 3 次,分别

测定,以视结果差异之大小或求得平均数字。

以上各种样品,其水分含量都很高,取样后须尽速进行分析,以防止水分损失而影响计算结果。

3. 水果与蔬菜

先将各种食物的废弃部去掉,只留可食部分,然后按以下方法制备。

(1) 新鲜物品:

① 小型:豆、豆荚、豆芽、枣、葡萄、杏等。当从小型生食品中采取有代表性的分析样品时,采取量的多少,要依整批样品的多少而定。将代表性样品混合均匀,避免损伤。用二分法或四分法,一次又一次分开,直到所得之量适于加入提取液打碎为止(一般的约为200～300g)。用适宜的提取液或稳定液将样品打碎成浆,取出一部分为分析之用。

② 大型:苹果、甜薯、西红柿、莴苣、茄子、胡萝卜、冬瓜、大白菜等。由不均匀的大体积单位组成的样品,应从多个单独样品中取样,以消除每个样品间的差异。样品个数的多少,视样品的种类和成熟的均匀与否,以及所需要测定维生素而定,一般为10～20个。

因全部样品的体积太大,在一般试验室所用的研磨器具中无法容纳,所以只能由每个单独样品取下一部分使用,最适当的方法是由每一个样品的对面,各切下一角(纵切)以减少其内部的差异。切下一角的大小,应视研磨或混合容量而定。最后从磨成的浆状物品取适当量,作为分析之用。

③ 散叶型:菠菜、韭菜、葱等。关于采取此类型样品应注意之处,与前节所述者相同。在制备支样时,所取总量以及各种类型组织(叶、茎、根等)之量,都应从每一个单位数量(一捆、一筐或一株)中按比例抽取。如必须将每一株上各部分组织分开,也须将分开的部分立刻浸在稳定液中以抑制酶的破坏作用。

④ 样品的保存:有时可能需要将新鲜样品暂时保存或是运送到离采样地点较远之处进行分析,因而必须将样品用稳定液做初步处理,以防维生素的损失。照前节所述方法,取得初级样品并做必要的重要记录之后,将需要分析的可食部分,按以下方法制备2份次级样品。

分样甲　为测定胡萝卜素或维生素A之用。称取切碎的均匀样品100g,装在200mL的棕色广口瓶内,即刻加50mL的1%的氢氧化钾酒精溶液(化学纯KOH 10g,加95%纯酒精990g),再加氯仿5mL,将瓶盖严、密封。也可用乳钵将样品很快磨碎,移至广口瓶内,用25mL 1%氢氧化钾溶液将乳钵冲洗2次,合并于瓶内,加氯仿5mL,盖严,密封。

分样乙　为测定B族维生素之用。称取切碎的均匀样品200g,放在300mL的棕色广口瓶内,立刻加100mL的0.05mol/L H_2SO_4(化学纯硫酸相对密度

1.84)(28mL 加到蒸馏水内稀释到 1000mL,即为 0.5mol/L H_2SO_4,再稀释 10 倍即成 0.05mol/L。盖严、密封。)

测定维生素 C 时,应尽可能用新鲜样品及早进行。在万不得已时,也可以用分样乙测定。

用上述稳定液处理的样品,可以保存一二个月,但须避免日光照射并放在阴凉之处,最好是放在冰箱内。在运送途中也以尽可能保持低温为宜。

(2) 罐头:当分析罐藏水果或蔬菜样品时,制样方法比较简单,小型散叶等类型的代表性样品可用 6 个 500g 或大于 500g 的罐装样品,大型的代表性样品可用 12 个罐装样品。

为了便于制备样品,可先将固体与汁液分开,将罐内物全部倒在一非铜质的筛子上(不锈钢、锡、铝质均可)过滤。将各罐固体混合,称每一部分混合均匀。按比例抽取固体与汁液,混合,加适当的提取液或稳定液,打碎,从浆状液抽取一部分做分析之用。

在制备检验样品,应特别注意的是:做钙测定的样品不可用石磨研碎,做铁测定的样品应避免与铁磨、刀或带铁盖的容器接触。

(三) 试样的预处理

食品中所含有的蛋白质、脂肪、糖类等对食品中维生素、微量元素等营养素的分析常产生干扰,因此在分析测定之前必须进行试样处理。处理试样必须注意既要排除干扰测定的因素,又要不使被测定的物质遭受损失,而且要使被测物质达到一定的浓缩,以使检出结果较佳。因此在食品的营养素的分析中,试样的预处理是全分析过程中重要的一环。

试样的处理方法应根据被测物质的理化性质以及食品的类型与特点而采取不同的处理方法。常用的方法简述如下。

1. 有机物破坏法

(1) 灰化法:将试样置灰化炉中(550℃)灰化,使试样的有机物质氧化尽。

(2) 湿消化法:在试样中加入强氧化剂,如浓硝酸、高氯酸、高锰酸钾等消化液使试样在加热过程中被消化而被测物质则呈离子状态于消化液中。

以上干、湿二种消化液常用于测定食品中的金属元素。

2. 蒸馏法

利用液体试样中各被测组分挥发度的不同而使被测组分分离。常用的蒸馏法有:

(1) 常压蒸馏:对于受热不易分解的物质或沸点不高的物质可用常压蒸馏法。可根据蒸馏物的沸点不同而采用水浴、油浴、砂浴、盐浴等。

(2) 减压蒸馏:在常压蒸馏条件下易分解的物质,或其沸点太高的物质,可

采用减压蒸馏。

3．溶剂提取法

在任一溶剂中,不同物质具有不同的溶解度,利用混合物中各组分在该溶剂中溶解度的差异,将混合物中的各组分分离。此种提取方法也称为萃取。常用方法有:

(1) 溶剂分层法：要从溶液中提取某一组分时,所选用的溶剂必须与溶液互不相溶但能与欲提取的组分互溶,由于此组分在两种互不相溶的溶剂中的分配系数不同,经多次提取可将待测组分提取出来。

(2) 浸泡法：从固体物中提取某种组分时,一般可采用浸泡法。采用的溶剂应能大量溶解欲提取的组分但不会破坏被提取组分。为了加速浸取效果,往往需加热浸取。例如索氏提取器就是浸泡法的一种仪器。

(3) 向试样溶液中加入一种盐类,使溶质(欲提取的组分)在水溶液中的溶解度降低而从溶液中沉淀出来,此方法即为盐析法。例如在含有蛋白质的溶液中加入盐类,如碱性醋酸铅可使蛋白质从水溶液中沉淀出来。

4．皂化法

皂化作用可以除去脂肪,而保留非皂化物以测定非皂化物中存留的待测成分。于试样中加入氢氧化钾,回流数小时即可达到皂化目的。

5．柱层分离法

层析法是食物成分检测中常用的分离方法之一。常用的色层分离有柱层析和薄层层析两种。

(1) 柱层析法：选用不同的吸附剂及极性强弱适宜的溶剂是净化效果的关键。常用的吸附剂有氧化铝、弗罗里矽土、活性炭和硅胶等。

(2) 薄层层析法：试样中的待测组分在薄层板上按各组分的极性不同随溶剂的展开而达到分离的效果。

(四) 试样的保存

制备好的试样最好是在当天进行分析,以免因试样在存放过程中丢失营养素而造成各待测物质含量的改变而使检测结果不准确。如果不能当天进行分析,就必须妥善保存试样。试样应保存在密封、洁净的容器内,存放在避光处,温度在0～5℃,在此条件下,试样不能长期保存,应尽快分析。

二、分析误差与数据处理

在分析化学的教科书中,一般都有专门讨论这个问题的章节。为了帮助食物分析工作者温习或了解这方面的知识,特在此部分中做一简要叙述。

(一) 食物分析中误差的表示法

在食物分析工作中,一项营养成分的测定结果与真实数字之间的差数称为

误差，通常用下列几种方法来表示。

1. 绝对误差

实验测得的数值与真实数值之间的差数称为绝对误差。例如测定大豆蛋白质的含量为38.88%，而真实数值为38.80%，则其绝对误差为+0.08%。绝对误差有正负号，正号表示分析结果偏高数，负号表示偏低数。

2. 相对误差

所谓相对误差，是绝对误差与真实数值的百分比。上述结果的相对误差为$\frac{38.88-38.80}{38.80}\times 100=+0.21\%$。相对误差也用正负号表示分析结果偏高或偏低。

3. 偏差

在一般食物分析工作中，样品中某种营养素的真实含量往往是不知道的，因而只能用多次分析结果的平均值代表分析结果，并以此作为"标准"，各个测得数值与平均值之差称为偏差。偏差也分为绝对偏差与相对偏差。绝对偏差指一次测量值与平均值的差数，$d=X-\bar{X}$；相对偏差指一次测量的绝对偏差占平均值的百分率，即：$\frac{d}{\bar{X}}\times 100$。

4. 标准差(s)

标准差是较常用的表示误差的方法，其计算式如下：

$$s=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i-\bar{X})^2}{n-1}}=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i-\bar{X})^2}{f}}$$

式中 s——测定值与平均值的绝对误差；

X_i——i次所测值；

$\bar{X}$——平均值；

n——测定次数；

$n-1$、f——自由度。

(二) 分析方法的质量鉴定

在实验室内建立一个新的分析方法，需要知道它的质量如何，才能评价它的测定结果。一般采用下列二种办法来评定一个分析方法的质量。

1. 精密度(precision)

精密度是衡量一个分析方法最常用的指标，它是从量上重复测量一个样品所得结果的分散度，通常用变异系数或称相对标准差(RSD)来表示，即同一样品经若干次数测定，所得结果的标准差占平均的百分率。

$$变异系数(相对标准差)=\frac{标准差}{平均值}\times 100=\frac{100s}{\bar{X}}$$

变异系数愈小，表明重复测定所得结果愈集中，则方法的精密度越高。

2. 准确度(accuracy)

一个分析方法的准确度是指对一个样品所得一组分析结果的平均值与真实数值之间的差数。然而，一个食物样品某种营养素的真实含量往往是不知道的，因此，在食物分析工作中一般用回收率来表示分析方法的准确度。在一个已测样品中，加入一定数量的纯品，然后再进行测定，计算回收率。

$$\text{回收率}=\frac{\text{加入标准后测得总量}-\text{原样品测得量}}{\text{加入标准纯品量}}\times 100$$

（三）有效数字运算规则

在食物分析和数字计算中，需要确定该用几位数字来代表测量或计算的结果才算合理。为了使新食物分析工作者掌握记录和计算数字的一般原则，现就有关事项做一简要说明。

1. 有效数字

在食物分析工作中要做观察数据的记录与计算。一般记录数值的最后一位数字是可疑数，倒数第二位是可靠数。可疑数以后即为无意义数，可根据小于5则舍，大于5则入，遇5时则按前一位数奇进偶舍的原则处理。例如，23.35保留三位得23.4，因为3是奇数；23.45保留三位数亦得23.4，因为4是偶数，这样记录的数字都是有效数字。当有效数字确定以后，则后面的可疑数字一律按此原则进行取舍。下面举例一位有效数字的取舍。

3.4999→3；3.4999不能进位到3.5，3.5也不能进位到4

3.5000→4　　　　　4.5000→4

在一项数字中，列于数字中间或末端的“0”都是有效数字。例502.3与53.20都是四位有效数字，但在数字之前的“0”是用来确定小数点的位置，不是有效数字，例如，0.0053只有两位有效数字。

任何测量数据，其有效数字必须根据所用测量仪器及方法的精确度来决定。用万分之一分析天平称量时可以准确地计算到小数点后第三位，第四位是估计值可能有±1的误差，故为可疑数。例：万分之一天平称量，试样为0.5183g。如果这一试样用普通的台秤称量，台秤只能准确到小数点后的第一位，保留小数点后二位就可以了，应该是0.52g，有效数字是二位，而记录0.5200就不对了。

还要区别数字的准确度和精密度的意义。一个数字的准确度是指这个数所含有效数字的个数。一个数字的精密度指最后一个有效数字对于零的位置。例如205.8的准确度是4位有效数字，5.2与0.0052都准确到2位数字，5.2精密到一位小数，而0.0052精密到小数4位，准确度与小数点的位置无关，而精密度则由小数点的位置决定。

2. 一般计算规则

记录测量数值时只保留一位可疑数字，多余的数字应按上述舍弃原则一律弃去。在计算数字时则应依照下列基本法则，一方面可以节省时间，同时又避免因计算过程过繁而引起错误。

(1) 加减法。当几个数据相加或相减时，它们的和或差，小数点后位数的保留，应依小数点后位数最少的数字为依据。例如将 13.65+0.0082+1.632 三数相加，在运算前先确定小数点后应保留的位数，然后再做计算，故为13.65+0.01+1.63=14.29。

(2) 乘除法。在乘除法中，各因子所保留的位数，以有效数字最少的为依据。例如 0.0121×25.64×1.05782 中，第一个数值的有效数字最少，故应以此数值为标准，确定其他数值的有效数字位数则为 0.0121×25.6×1.06=0.328。

(3) 在计算平均数时，若有≥4 个数相平均，均数的有效数字可以增加一位。平均数的有效数字的位数还决定于样品的变化，可根据 1/3 标准差而定。例如(3615.2±920.8)g，标准差超于 900g，1/3 也达 300g，则平均值必然波动在百位数，十位数以下即无意义，故应写成(3.6±0.9)kg。

(4) 当计算有效数字时，若第一位大于 8，则有效数字可增加一位，例如 84 虽然是 2 位，但在计算有效数字时，可以做 3 位计算。

三、分析结果的表述

平行样的测定值，报告其算术平均值，一般测定值的有效位数应根据所采用的仪器和检测方法的精确度和检出限而确定。试样测定值的单位，常用单位以每 100g 试样中含 g、mg、μg 或摩尔来表示"营养素"的量；"能量"的表示单位用每 100g 试样中含 kJ 表示。

四、实验室的质量控制

为对检验结果起保证作用，食物成分检测实验室应实行检测质量控制。因此必须有实行质量控制的规范。质量控制的基本点是要求产生可靠的数据，其前提是要有合适的测量方法、正确的校准和良好的实验室条件，以及良好的操作技巧。

质量控制的基本要素如下：

1. 检测人员的技术能力

技术人员的专业水平对减少实验结果的变动性，使检测结果能保持在一定的水平上是非常重要的因素。

2. 适当的仪器和设备

现代的化学分析需有专门的测量设备和仪器，以及实验室的环境都要有相



应的条件。仪器和设备的良好操作、维修和保养，定期校准以及良好地保管制度等都是必需的。

3．规范化的实验操作和良好的检测技术

实验室的操作包括设备的维修、记录、试样处理、试样配制以及玻璃器皿的清洗等环节。各实验室均应制定出相应的规章。

良好的检测操作是对某些特殊的测量技术的要求，它还包含了检测人员的技术水平和实践经验，以及仔细的测量操作记录，尤其是关键的操作。

4．标准化的操作步骤

这些操作步骤的标准化包括样本采集、试样处理、仪器的校准以及测量的详细操作步骤。

5．检测结果的出具

必须明确地做好文字记录和数据报告，要认真仔细抄写以免错误。内容的修改必须有正当的理由，而且要加以注明。个人所做的修改应在修改处写上姓名，随意删除记录或数据是不允许的。对测量负责的人员应在报告上签字，以表明检测内容的正确性。建议执行一种监督体系及由检测人员的上级主管部门"会签"的体系。

6．检测人员的技术培训

加强教育和技术培训是测量技术水平提高的先决条件。现代化学的复杂性及分析技术的飞速发展和新技术的应用，使一般专业技术人员必须定期接受培训以适应技术水平发展的需要，以及不断提高技术人员的技术水平。此外也必需使检测人员熟悉检测中质量控制的规范和要求，实验室的质量保证手册应作为基本教材。

五、检测人员的职责（技术职责、行为规范）

检测人员对出具正确的检测数据负有直接责任，因此检测人员的重要职责是按实验室的技术规范和要求进行实验。应做到以下几点：

（1）检测工作中执行规定的检测方法和技术操作步骤，不任意改变方法或省略某些操作步骤。

（2）做好实验记录，正确表述检测结果。注意有效数字的应用和结果的真实性。

（3）维护好所使用的仪器和设备。

（4）实验前做好实验室环境的清洁，所用器皿的洁净和校准工作。

（5）注意试剂的规格，正确使用和配制。

（6）注意采样，正确制备试样和试样的贮存、保管及完善的记录。

第三章　宏量营养素的分析

按照中国营养学会 DRI 委员会的分类和名称，宏量营养素包括蛋白质、脂类、碳水化合物（糖类）。宏量营养素的意思表示其在人体含量为最多，实际上在食物中这些营养素的含量也是较丰富和广泛存在的。不同的食物中蛋白质、脂类和碳水化合物除了含量不同外，其组成上常表现出显著不同。因为蛋白质的氨基酸组成有 20 种；碳水化合物是自然界最为丰富的一类有机化合物，其组成多达百种；脂肪酸也有 20 余种。

本章将介绍的分析方法包括以上三大营养素和他们的组成成分的测定方法。

第一节　蛋白质及氨基酸的测定方法

一、蛋白质的测定方法

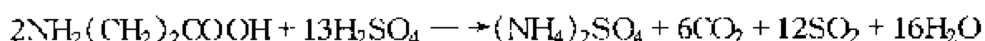
（一）凯氏微量法

本法系凯氏微量法，有手工滴定定氮和自动定氮仪定氮两种方法。

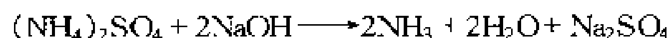
根据经济条件设备而定。

1. 原理

蛋白质是含氮的有机化合物。食品与硫酸和催化剂一同加热消化，使蛋白质分解，分解的氨与硫酸结合生成硫酸铵。然后碱化蒸馏使氨游离，用过量硼酸吸收后再以硫酸或盐酸标准溶液滴定，根据酸的消耗量乘以换算系数，即为蛋白质含量。



$$2NH_2(CH_2)_2COOH + 13H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4 + 6CO_2 + 12SO_2 + 16H_2O$$



$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \longrightarrow 2NH_3 + 2H_2O + Na_2SO_4$$

2. 适用范围

本法参照 GB 5009.5—85。适用于各类食品及饲料中蛋白质的测定。

3. 试剂

所有试剂均用不含氨的蒸馏水配制。试剂均为分析纯。

（1）$CuSO_4$。

（2）K_2SO_4。

（3）浓 H_2SO_4。

(4) 2% H_3BO_3 溶液(或1%的硼酸)。

(5) 混合指示剂:1份0.1%甲基红乙醇溶液与5份0.1%溴甲酚绿乙醇溶液临用时混合。也可用2份0.1%甲基红乙醇溶液与1份0.1%次甲基蓝乙醇溶液临用时混合。

(6) 饱和氢氧化钠:500g氢氧化钠加入500mL水中,搅拌溶解,冷却后放置数日,澄清后使用。

(7) 0.01mol/L或0.05mol/L HCl标准溶液:需标定后使用(见附录)

4. 仪器

(1) 消化炉。

(2) 凯氏定氮蒸馏装置。

(3) 万分之一电子天平。

凯氏定氮蒸馏装置:如图3-1所示。

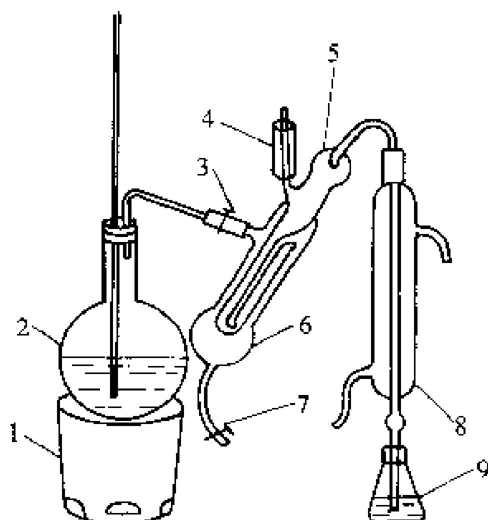


图 3-1 凯氏定氮蒸馏装置

1—电炉 2—水蒸气发生器(2L平底烧瓶) 3—螺旋夹 4—小玻杯及棒状玻塞 5—反应室 6—反应室外层 7—橡皮管及螺旋夹 8—冷凝管 9—蒸馏液接收瓶

5. 操作步骤

(1) 样品处理:精密称取0.1~2.0g固体样品或2~5g半固体样品或吸取液体样品5~20mL,放入100mL或500mL凯氏烧瓶中,加入0.2g硫酸铜、0.3g硫酸钾及3~20mL浓 H_2SO_4,放置过夜后小心加热,待内容物全部炭化,泡沫完全停止后,加强火力,并保持瓶内液体微沸,至液体呈蓝绿色澄清透明后,取下放冷后用约2~10mL蒸馏水冲洗瓶壁,混匀后继续加热至液体呈蓝绿透明,取下放冷,小心加10~20mL水混匀,放冷后,移入100mL容量瓶中,并用少量水洗定氮瓶,洗液并入容量瓶中,再加水至刻度,混匀备用。取与处理样品相同量的硫酸铜、硫酸钾、硫酸按同一方法做试剂空白实验。

（2）按图装好定氮装置，于水蒸气发生瓶内装水至约 2/3 处，加甲基红指示液数滴及数毫升硫酸，以保持水呈酸性，加入数粒玻璃 珠以防暴沸，加热煮沸水蒸气发生瓶内的水。

（3）向接收瓶内加入 10mL，1%～2%硼酸溶液及混合指示液 1 滴，并使冷凝管的下端插入液面下，吸取 10mL 样品消化稀释液由小玻璃杯流入反应室，并以 10mL 水洗涤小烧杯使之流入反应室内，塞紧小玻璃杯的棒状玻璃塞。将3～10mL 饱和氢氧化钠溶液倒入小玻璃杯中，提起玻璃塞使其缓缓流入反应室，立即将玻璃塞盖紧，并加水于小玻璃杯中以防漏气。加紧螺旋夹，开始蒸馏。蒸汽通入反应室使氨通过冷凝管而进入接收瓶内，蒸馏 2min，移动接收瓶，使冷凝管下端离开液面，然后用少量中性水冲洗冷凝管下端外部，再蒸馏 1min 取下接收瓶，以 0.01mol/L 或 0.05mol/L HCl 标准溶液滴定至灰色或蓝紫色为终点。

同时吸取 10mL 试剂空白消化液按 5(3)操作。

6．计算

$$w=(V-V_0)\times c\times 0.014\times \frac{V_1}{m_1}\times 100\times f$$

式中　w ——样品中蛋白质含量，g/100g；

V ——样品消耗盐酸标准液的体积，mL；

V_0 ——空白消化液消耗盐酸标准液体积，mL；

c ——盐酸标准液浓度，mol/L；

0.014 ——$\frac{1}{2}N_2$ 的毫摩尔质量，g/mmol；

V_1——定容体积/取液量；

m_1——称取样品的质量，g；

f ——氮换算为蛋白质的计算因子、蛋白质的氮素含量不同，故计算因子不同。详见表 3－1。

表 3－1　蛋白质计算因子

食　物	计算因子
蛋，鱼，肉及制品，禽类，玉米，高粱，豆类，水果和蔬菜类	6.25
乳及乳制品	6.38
大米	5.95
小麦面普通粉	5.70
全麦，大麦，燕麦，裸麦，小米，小麦面全麦	5.83
小麦	5.80
黄豆	5.71
花生	5.46
芝麻，葵花子，核桃和榛子	5.30
麸皮	6.31

7. 举例

设称取样品 0.1000g，消化后稀释至 100mL；取 10mL 样品稀释液，标准盐酸为 0.01mol/L，空白滴定为 0.12mL；样品滴定用去的标准盐酸为 3.21mL；测得样品中蛋白质百分率为：

$$蛋白质含量,g/100g=(3.21-0.12)\times0.01\times0.014\times\frac{100}{0.1\times10}\times100\times6.25$$

$$=(3.21-0.12)\times0.0875\times100=27.0g/100g$$

8. 其他

（1）标准 HCl 溶液配制及标定：

0.1mol/L HCl：①配制：量取 9mL HCl，加适量水稀释至 1000mL。

② 标定：精确称取约 0.15g 左右在 270～300℃ 干燥至恒重的基准无水碳酸钠，加 50mL 水使之溶解，加 10 滴溴甲酚绿－甲基红混合指示液，(量取 30mL 0.2%溴甲酚绿乙醇溶液，加入 20mL 0.1%甲基红乙醇溶液，混匀)用配制的盐酸滴定至溶液由绿色变紫红色，煮沸 2min，冷却至室温，继续滴定至溶液由绿色变为暗紫色。同时做试剂空白实验。

（2）计算：

$$c=\frac{m}{(V-V_0)\times0.0530}$$

式中　c——HCl 标准滴定溶液的实际浓度，mol/L；

m——基准无水碳酸钠的质量，g；

V——HCl 标准滴定溶液用量，mL；

V_0——试剂空白 HCl 标准滴定溶液用量，mL；

0.0530——$\frac{1}{2}NaCO_3$ 的毫摩尔质量，g/mmol。

0.01mol/L HCl：精确吸取标定过的 0.1mol/L HCl 10mL，准确稀释至 100mL。必要时重新标定浓度。

9. 注意事项

（1）干样用称量纸称重连纸一同消化，空白管同样放称量纸消化。

（2）含糖量高和油脂高的样品消化时容易溢出，加热要缓慢。

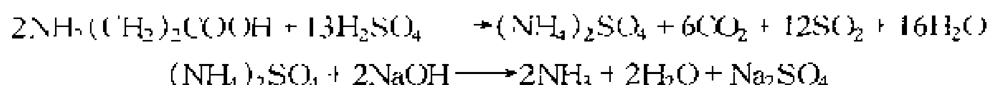
（3）稀释样品时消化液过热，加水反应猛烈使样品损失，消化液过冷，加水后盐析不溶解。

（二）自动定氮分析法

1. 原理

本方法为凯氏微量定氮法，是将蛋白质的氮素转化成氨，与硫酸化合成硫酸铵，然后测定氨量，由此计算出氮素含量，再乘以相应的系数即为蛋白质含量。

化学反应式如下：



$$2NH_2(CH_2)_2COOH + 13H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4 + 6CO_2 + 12SO_2 + 16H_2O$$

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \longrightarrow 2NH_3 + 2H_2O + Na_2SO_4$$

2．适用范围

本法适用于各种食物和饲料的测定(GB/T 6432—94)。

3．仪器

KJELTEC 1030 自动分析仪(瑞典特卡托公司)40 孔消化炉。

4．试剂

本实验所用试剂皆为分析纯，所用水皆为蒸馏水。

(1) 浓硫酸　98% H_2SO_4。

(2) 凯氏片(催化剂)K_2SO_4 + Se。

(3) 40%氢氧化钠溶液(NaOH)(mg/L)。

(4) 无水硫酸钠(Na_2SO_4)。

(5) 1%硼酸(H_3BO_3)吸收液　称取 100g 硼酸溶于 10L 水中。加入 100mL 溴钾酚绿溶液，再加入 70mL 甲基红溶液，最后加入 3mL 4%氢氧化钠溶液。

(6) 0.1mol/L 盐酸(HCl)标准溶液，标定后使用。

5．操作步骤

(1) 样品消化：称取一定量的样品于消化管中(半固体样品用称量纸称取)，加一粒凯氏片于消化管中，然后加入 5mL 浓硫酸，放置过夜，同时做样品空白管。在消化过程中，先用低温消化(防止高温消化时样品溢出)，低温消化 1h 后，将温度升到最高挡，至消化液无色透明。待消化液冷却后，加入少量水冲洗消化管内壁，振摇，以免内壁黏有样品以致消化不完全。然后于消化炉上再消化，直至液体无色透明。放置室温后，加水至 25mL，待测。

(2) 样品定氮：开启 1030 自动分析仪电源，输入测定时的参数，打开 STEAM 按钮，产生蒸汽 5min，同时调节蒸汽表，使蒸汽表的指针指到 NORMAL。最后将消化管装入，关闭安全门，开始自动定氮。当 CYCLE OVER 灯亮时，记录滴定结果，打开安全门，进行下一个样品测定。

6．计算

$$w = (V - V_0) \times 0.01401 \times c \times \frac{f}{m} \times 100$$

式中　w ——蛋白质含量，g/100g；

V ——样品消耗盐酸标准液的体积，mL；

V_0 ——试剂空白消耗盐酸标准液的体积，mL；

c ——盐酸标准溶液的浓度，mol/L；

0.01401 ——$\frac{1}{2}N_2$ 的毫摩质量，g/mmol；

f ——氮换算为蛋白质的系数（一般样品的系数为 6.25）；

m ——样品的质量，g。

7．注意事项

（1）对含糖高的样品或油脂样品在消化过程中必须先低温消化，防止样品溢出，消化所需时间较长。

（2）样品的称样量不宜过多，否则试剂消耗多，消化时间长，适宜称样范围在 0.05～2.00g 之间。

（3）消化液过冷，在加水时，消化液有盐析出。将消化管放在消化炉上加热，使沉淀溶解。

（4）使用自动分析仪时，定氮前，应将管路中的吸收液排出去，因为管路中的吸收液长时间停留会变色。

（5）在产生蒸汽的水中加入无水硫酸钠是为了提高水中的电解质。

（6）本仪器消耗盐酸标准溶液的用量最佳范围在 0.5～7mL。

二、食物中氨基酸的测定方法

（一）氨基酸自动分析仪法

1．原理

食物蛋白质经盐酸水解成为游离氨基酸，经氨基酸分析仪的离子交换柱分离后，与茚三酮溶液产生颜色反应，再通过分光光度计比色测定氨基酸含量。可同时测定天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸和精氨酸等 16 种氨基酸，其最低检出限为 10pmol。

2．适用范围

GB/T 14965—1994 食物中氨基酸的测定方法。本方法适用于食物中的 16 种氨基酸的测定。其最低检出线为 10pmol。本方法不适用于蛋白质含量低的水果、蔬菜、饮料和淀粉类食物的测定。

3．仪器和设备

（1）真空泵。

（2）恒温干燥箱。

（3）水解管。

（4）耐压螺盖玻璃管或硬质玻璃管，体积 20～30mL。

（5）真空干燥器（温度可调节）。

（6）氨基酸自动分析仪。

4. 试剂

全部试剂除注明外均为分析纯，实验用水为去离子水。

(1) 浓盐酸(HCl)：优级纯。

(2) 6mol/L HCl：浓盐酸与水1:1混合而成。

(3) 苯酚：需重蒸馏。

(4) 混合氨基酸标准液(仪器制造公司出售)：0.0025mol/L。

(5) 缓冲液：

① pH2.2的柠檬酸钠缓冲液：称取19.6g柠檬酸钠($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)和16.5mL浓盐酸加水稀释到1000mL，用盐酸或50%的NaOH溶液调节pH至2.2。

② pH3.3的柠檬酸钠缓冲液：称取19.6g柠檬酸钠和12mL浓盐酸加水稀释到1000mL，用浓盐酸或50%的氢氧化钠溶液调节pH至3.3。

③ pH4.0的柠檬酸钠缓冲液：称取19.6g柠檬酸钠和9mL浓盐酸加水稀释到1000mL，用浓盐酸或50%的NaOH溶液调节pH至4.0。

④ pH6.4的柠檬酸钠缓冲液：称取19.6g柠檬酸钠和46.8g氯化钠(优级纯)加水稀释到1000mL，用浓盐酸或50%的NaOH溶液调节pH至6.4。

(6) 茚三酮溶液：

① pH5.2的乙酸锂溶液：称取氢氧化锂($LiOH \cdot H_2O$)168g，加入冰乙酸(优级优)279mL，加水稀释到1000mL，用浓盐酸或50%的NaOH调节pH至5.2。

② 茚三酮溶液：取150mL二甲基亚砜(C_2H_6OS)和乙酸锂溶液50mL加入4g水合茚三酮($C_9H_4O_3 \cdot H_2O$)和0.12g还原茚三酮($C_{18}H_{10}O_6 \cdot 2H_2O$)搅拌至完全溶解。

(7) 高纯氮气：纯度99.99%。

(8) 冷冻剂：市售食盐与冰按1:3混合。

5. 操作步骤

(1) 样品处理：样品采集后用匀浆机打成匀浆(或尽量将样品粉碎)于低温冰箱中冷冻保存分析用时将其解冻后使用。

(2) 称样：准确称取一定量样品，精确到0.0001g。均匀性好的样品如奶粉等，使样品蛋白质含量在10～20mg范围内；均匀性差的样品如鲜肉等，为减少误差可适当增大称样量，测定前再稀释。将称好的样品放入水解管中。

(3) 水解：在水解管内加6mol/L盐酸10～15mL(加酸量视样品蛋白质含量而定)，含水量高的样品(如牛奶)可加入等体积的浓盐酸，加入新蒸馏的苯酚3～4滴，再将水解管放入冷冻剂中，冷冻3～5min，再接到真空泵的抽气管上，抽真空(1333.22～2666.44Pa)，然后充入高纯氮气；再抽真空充氮气，重复3次后，



在充氮气状态下封口或拧紧螺丝盖将已封口的水解管放在(110±1)℃的恒温干燥箱内，水解 22h 后，取出冷却。

打开水解管，将水解液过滤后，用去离子水多次冲洗水解管，将水解液全部转移到 50mL 容量瓶内，用去离子水定容。吸取滤液 1mL 于 5mL 容量瓶内，用真空干燥器在 40～50℃ 干燥，残留物用 1～2mL 水溶解，再干燥，反复进行 2 次，最后蒸干，用 1mL pH2.2 的缓冲液溶解，供仪器测定用。

(4) 测定：准确吸取 0.200mL 混合氨基酸标准，用 pH2.2 的缓冲液稀释到 5mL，此标准稀释浓度为 5.00nmol/50μL，作为上机测定用的氨基酸标准，用氨基酸自动分析仪以外标法测定样品测定液的氨基酸含量。

(5) 允许差：同一实验室的平行测定或连续两次测定结果相对偏差绝对值≤12%。

6．计算

上机样品液(50μL)中氨基酸量(nmol)＝

$$\frac{\text{上机标准液(50μL)中氨基酸量(nmol)}\times\text{样品峰面积}}{\text{氨基酸标准峰面积}}$$

所以：100g 样品中氨基酸的 mg 数＝

$$\frac{\text{上机样品液中氨基酸总量(nmol)}\times f\times M_r\times 100}{m\times V\times 10^6}$$

式中　f ——样品的稀释倍数；

M_r ——氨基酸的相对分子质量；

m ——样品质量，g；

V ——上机时的进样量(此处为 50μL)。

[注：①样品中氨基酸的含量在 1.00g/100g 以下，保留两位有效数字，含量在 1.00g/100g 以上，保留三位有效数字。②16 种氨基酸相对分子质量：天冬氨酸：133.1，苏氨酸：119.1，丝氨酸：105.1，谷氨酸：147.1，脯氨酸：115.1，甘氨酸：75.1，丙氨酸：89.1，缬氨酸：117.2，蛋氨酸：149.2，异亮氨酸：131.2，亮氨酸：131.2，酪氨酸：181.2，苯丙氨酸：165.2，组氨酸：155.2，赖氨酸：146.2，精氨酸：174.2。]

7．其他

(1) 测定条件(以 Beckman6300 型氨基酸自动分析仪为例)

缓冲液流量：20mL/h；

茚三酮流量：10mL/h；

柱温：50、60℃ 和 70℃；

色谱柱：20cm；

分析时间：42min。

(2) 标准出峰顺序和保留时间如下表。

序号	出峰顺序	保留时间/min	序号	出峰顺序	保留时间/min
1	天冬氨酸	5.55	9	蛋氨酸	19 63
2	苏氨酸	6.60	10	异亮氨酸	21.24
3	丝氨酸	7.09	11	亮氨酸	22.06
4	谷氨酸	8.72	12	酪氨酸	24.52
5	脯氨酸	9.63	13	苯丙氨酸	25.76
6	甘氨酸	12.24	14	组氨酸	30.41
7	丙氨酸	13.10	15	赖氨酸	32 57
8	缬氨酸	16.65	16	精氨酸	40.75

(3) 标准图：如图 3－2 所示。

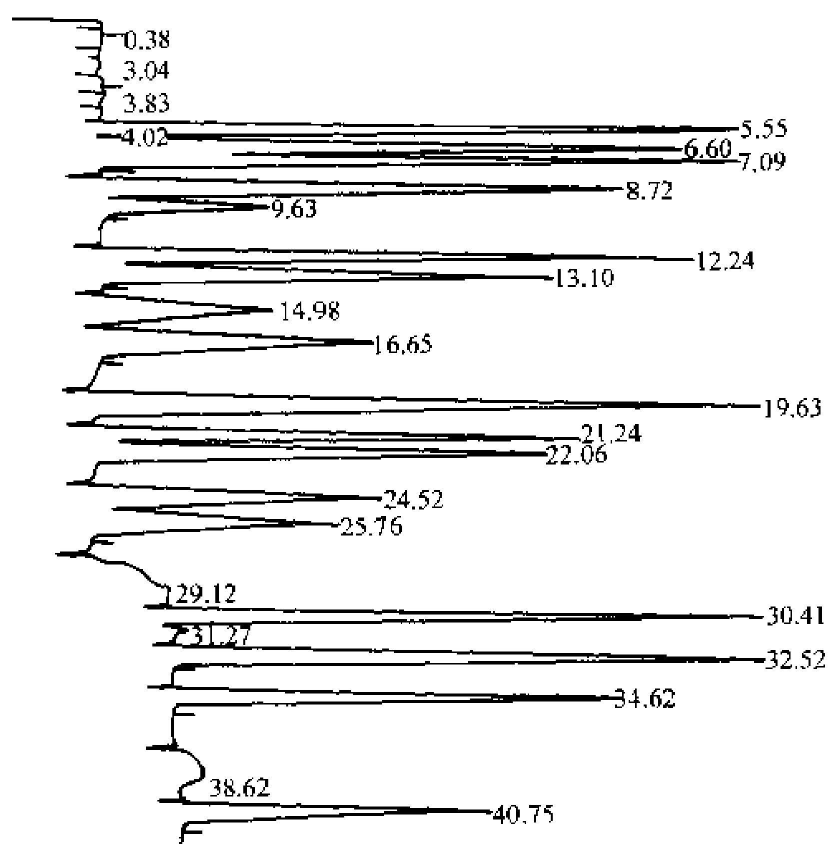
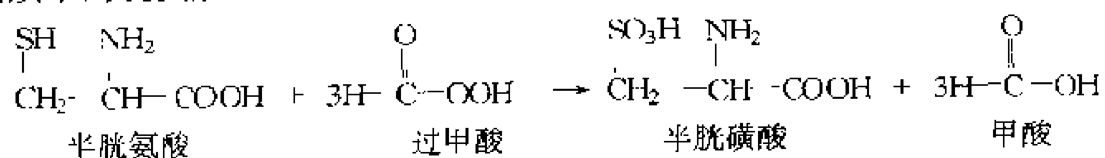


图 3－2　氨基酸标准图谱

(二) 胱氨酸的测定——氨基酸自动分析仪法(过甲酸氧化)

1. 原理

在用盐酸水解蛋白质的过程中，胱氨酸易被破坏，现多采用过甲酸氧化法将蛋白质中的胱氨酸及半胱氨酸氧化成半胱磺酸，其反应如下：



生成的半胱磺酸可在氨基酸自动分析仪上进行测定，与标准半胱磺酸比较，计算其含量。

2. 适用范围

参照中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编写的食物营养成分测定法第三版。适用食物中胱氨酸的测定。

3. 仪器

水解瓶：耐压螺盖玻璃管或硬质试管，体积 20～30mL，用去离子水冲净并烘干，电热减压蒸发器。

4. 试剂

过甲酸：取 9mL 分析纯甲酸加入 1mL 30%过氧化氢混合，在室温放置 2h 以上。

5. 操作步骤

(1) 过甲酸氧化：称取一定量的食物样品置于水解瓶中，使样品含蛋白质在 5～10mg，加入 1mL 过甲酸试剂，在室温放置 3h。加 1mL 乙醇终止氧化。将样品瓶置于电热减压器中，于 45℃减压蒸干，用 1mL 去离子水淋洗瓶壁，再蒸干，反复 3 次，以除去过甲酸。

(2) 盐酸水解：同食物中氨基酸(16 种)测定方法。

(3) 在 Beckman 6300 氨基酸自动分析仪上，在柱温 50℃时用 pH3.25 柠檬酸缓冲液洗脱，半胱磺酸的出峰时间约在 1.78min。

6. 计算

$$\text{上机样品液}(50\mu L)\text{中半胱磺酸量} = \frac{\text{上机标准液中半胱磺酸量(nmol)} \times \text{样品峰面积}}{\text{半胱磺酸标准峰面积}}$$

$$100g\text{样品中胱氨酸毫克数} = \text{上机样品中半胱磺酸量(nmol)} \times \frac{f \times M_r \times 100}{m \times E \times 10^6 \times 2}$$

式中　f——样品稀释倍数；

M_r——胱氨酸相对分子质量；

m——样品质量，g；

E——上机时的进样量(此处为 $50\mu L$)。

(三) 食物中色氨酸的测定——荧光分光光度法

1. 原理

食物中蛋白质的色氨酸在酸水解过程中，极易被分解，本法用碱水解蛋白质，直接测定色氨酸的天然荧光。在蛋白质水解液中，只有色氨酸和酪氨酸可以检测到荧光。在 pH 为 11 时，色氨酸的荧光强度比酪氨酸大 100 倍，且两种氨基酸的荧光峰相差 40nm，利用此特点，可在有大量酪氨酸的存在下，检测色氨酸的含量。

2. 适用范围

参照中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编写的食物营养成分测定法第三版。适用于食物中色氨酸的测定。

3．仪器

（1）荧光分光光度计。

（2）减压蒸发器。

（3）螺旋盖大口瓶(瓶盖要有橡皮垫)。

（4）聚四氟乙烯管。

（5）小玻璃球。

（6）烘箱。

4．试剂

（1）5mol/L NaOH：内含0.5%可溶性淀粉，临用前配制。

（2）4mol/L 尿素(pH=11)。

（3）6mol/L HCl。

（4）溴百里酚蓝指示剂：称取0.1g溴百里酚蓝加0.1mol/L NaOH1.6mL，配成0.05%水溶液。

（5）高纯氮(含量99.999%)。

（6）辛醇甲苯溶液：内含1%辛醇。

（7）色氨酸标准液：(1mg/mL)：称取色氨酸标准100mg，用0.005mol/L NaOH溶液溶解，并定容至100mL，贮存于冰箱保存。

5．操作步骤

（1）称取含粗蛋白质约5mg的食物样品，置于聚四氟乙烯管中，加含可溶性淀粉的5mol/L氢氧化钠1mL，加入1滴辛醇甲苯溶液。

（2）将各管分别盖上小玻璃球，放入1只带螺旋盖的大口玻璃瓶中，将瓶置于减压蒸发装置中，加冰和盐降温，减压至真空度1.3kPa(10mmHg)以下，继续保持15min，充氮气再减压，如此反复3次，迅速旋紧大口瓶的螺旋盖。

（3）将充氮气的大口瓶置于烤箱内，在110℃水解样品22h。

（4）冷却大口瓶，用重蒸馏水将样品分别洗至25mL容量瓶中(内含6mol/L HCl 0.7mL)用溴百里酚蓝为指示剂调pH至中性，用重蒸水定容至刻度。

（5）吸取样品液1mL于10mL带盖试管内，用pH11的4mol/L尿素溶液稀释至刻度，在激发波长为280nm，发射波长为360nm下测定荧光强度，根据标准色氨酸的荧光强度曲线，计算样品中色氨酸含量。

（6）色氨酸标准曲线：用前将标准贮备液稀释成每1mL含100、200、300、400μg的色氨酸标准系列。取每种浓度的标准液各1mL(双份)与样品管同样加试剂，同时水解，以色氨酸标准浓度为横坐标，荧光强度为纵坐标绘制标准曲线。

6. 结果计算

$$每100g样品中的色氨酸含量(mg)=\frac{m\times f\times 100}{1000\times m_1}$$

式中 m ——根据标准曲线得到的每1mL测定液中色氨酸的含量,mg;

f ——稀释倍数;

m_1 ——样品质量,g。

(四) 柱前衍生法

本方法最低检出限,紫外检测为50pmol;荧光检测为5pmol。

1. 原理

样品中的蛋白质经盐酸水解成游离氨基酸,用OPA/3-MPA—FMOC-CL分别进行一级氨基酸和二级氨基酸衍生,经HPLC反相分离后,用紫外或荧光检测。

2. 适用范围

本方法适用于食物及生物材料中氨基酸的检测。

3. 仪器

(1) HP 1050液相色谱仪:HP 1050四元梯度泵,HP 1046A荧光检测器,HP 1050自动进样器,HP柱加温器,HPLC-2D色谱工作站;或带色谱工作站,自动进样器,可变波长的紫外或荧光检测器、柱加温器的HPLC。

(2) 20mL安瓿瓶或具螺口的硬质试管。

(3) 高纯氮气。

(4) 冷冻离心机及超滤设备。

4. 试剂

(1) 水为二蒸水并经Milli-Q超纯处理。

(2) 盐酸:A.R.6mol/L。

(3) 苯酚:A.R.重蒸馏。

(4) 乙腈:色谱纯。

(5) 甲醇:色谱纯。

(6) 无水乙醇:A.R.。

(7) 磷酸氢二钠:A.R.$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$。

(8) 磷酸二氢钠:A.R.$NaH_2HPO_4\cdot 2H_2O$。

(9) 12.5mmol/L磷酸盐缓冲液(pH=7.2)。

称取磷酸氢二钠6.267g,磷酸二氢钠1.170g溶于1800mL水中,用1mol/L HCl或NaOH调pH为7.20±0.02,用水稀释至2000mL,用0.45μm滤膜过滤后备用。

(10) 0.1mol/L四硼酸钠缓冲液(pH10.4):称取四硼酸钠38.137g四硼酸钠A.R.$Na_2B_4O_7\cdot 10H_2O$溶于800mL水中,再以0.1mol/L NaOH调pH至

10.40±0.1,并用水稀释至1000mL,用0.45μm滤膜过滤后备用。

(11) 巯基丙酸: 3-Mercaptopropionic acid(3-MPA),或巯基乙醇(β-MCE).SIGMA.

(12) OPA(O-phthalaldehyde)(邻-苯二甲醛)SIGMA。

称取10mgOPA用0.2mL无水乙醇溶解,再加入0.8mL 0.1mol/L四硼酸钠缓冲液混匀,最后加入10μL巯基丙酸或巯基乙醇。在4℃冰箱中可稳定一周。

(13) FMOC-CL(9-Fluorenylmethyl chloroformate)(9-芴基甲氧基羰酰氯)(氯甲酸芴甲酯)SIGMA: 配成10mg/mL的乙腈溶液。

(14) 四氢呋喃(THF)(Tetrahydrofuran): 色谱纯。

(15) 氨基酸标准液: HP 0.250μmol/mL18种氨基酸混合标准液 U.S.A。

(16) 氢氧化钠: 4.2mol/L,取84g氢氧化钠溶于水中定容至500mL。

(17) 1-辛醇: AR色谱纯。

5. 色谱条件

(1) 流动相:

① 流动相A: 取1000mL12.5mmol/L pH7.20的磷酸盐缓冲液+5mL四氢呋喃。

② 流动相B: 取500mL12.5mmol/L pH7.20的磷酸盐缓冲液+350mL甲醇+150mL乙腈。

(2) 色谱柱: HP Hypersil ODS 5μm(125×4.0)mm。

(3) 流量: 1mL/min。

(4) 柱温: 40℃。

(5) 检测波长: 荧光: 激发波长340nm, 发射波长450nm 21min后激发波长260nm,发射波长305nm

紫外: 340nm,21min后265nm.

(6) 衰减: HP 1046A荧光检测器 PMGgain 0min: 12,21min: 10.

(7) 梯度程序:

先用流动相B平行30min,再用流动相A平行30min。

时间/min	A/%	B/%
0	100	0
25	0	100
35	0	100
35.1	100	0
45	100	0

(8) 进样量：自动衍生 1μL；

手动衍生 10～20μL。

6. 操作步骤

(1) 水解氨基酸：

用长滴管连接高纯氮气钢瓶并将管伸至干燥的安瓿瓶(或具螺口的硬质试管)底部充氮，取适量样品(含蛋白 20～80mg)于水解管中，加 10mL 6mol/L HCl (如液体样品可加等体积的浓盐酸)，加几滴新蒸馏的苯酚，再充氮气后封管，置 110℃ 烘箱中 22h，冷却后用定性滤纸过滤并定容至 100mL，取 5mL 此滤液用水稀释至 25mL 刻度，精滤，供 HPLC 分析用。

(2) 游离氨基酸：

① 固体样品：取适量样品加 0.1mol/L HCl 用超声波处理提取氨基酸，液体样品用水稀释成合适的浓度或精滤后直接进样测定，如有蛋白质可加乙醇沉淀除去：取 5mL 液体样品或固体样品的提取液于 25mL 容量瓶中，用无水乙醇稀释至刻度，混匀，置 4℃ 冰箱中 30min，然后冷冻离心，取上清液或稀释至合适浓度，精滤后用于分析。

② 血清或血浆样品：取血清或血浆样品 1.0mL 于 5mL 容量瓶中，用无水乙醇稀释至刻度，同上操作。

(3) 色氨酸：取相当于 20～80mg 蛋白的样品，于已充氮的具螺口聚四氟乙烯的塑料管中，加入 10mL 除氧的 4.2mol/L NaOH，再加入 3 滴 1－辛醇，于 110℃ 中水解 20h，冷却后，将水解物转移并过滤到 50mL 容量瓶中，加 7mL 6mol/L HCl 中和，用水稀释至刻度，再适当稀释成合适的浓度，精滤，供 HPLC 分析。

(4) 用 HP 1050 HPLC 自动在线衍生：

衍生程序：	DRAW	0.0μL	from	Vial	4(水)
	DRAW	2.0μL	from	Vial	3(四硼酸钠缓冲液 pH10.4)
	DRAW	2.0μL	from	Vial	1(OPA/3MPA)
	DRAW	0.0μL	from	Vial	4(水)
	DRAW	1.0μL	from sample(0.25μmol/mL standard)或(sample)		
	MIX	5.0μL	in seat，200μL/min 速度，5 次		
	WAIT	1.0min			
	DRAW	0.0μL	from	Vial	4(水)
	DRAW	1.0μL	from	Vial	2(FMOC－CL)
	MIX	6.0μL	in seat，200μL/min 速度，5 次		
	WAIT	1.0min			
	INJECT				

(5) 手动进样：用微量吸样器吸取 100μL OPA 于 1.5mL 具盖的塑料离心管中，加 10μL0.25μmol/mL 的混合标准(或样品)，立即计时并迅速在旋涡混合器中混匀，准确计时 2min 后立即加入 10μL FMOC－CL，再计时，并迅速在旋涡混合器中混匀，准确计时 2min 后立即进样测定。

(6) 标准溶液的出峰顺序：

以 18 种氨基酸为例：天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr)、组氨酸(His)、丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、酪氨酸(Tyr)、胱氨酸、缬氨酸(Val)、甲硫氨酸、色氨酸、苯丙氨酸(Phe)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸 1(Lys1)、赖氨酸 2(Lys2)、脯氨酸(Pro)、蛋氨酸(Met)，如图 3－3。



图 3－3 标准溶液出峰顺序图(本图缺胱氨酸、色氨酸)

7. 计算

(1) 自动衍生：在 HPLC 色谱工作站直接读数。

(2) 手动衍生：按下计算：

$$x = \frac{A_1 \times c \times M_r \times V \times 100}{A_2 \times m \times 1000} \times D$$

式中 x ——氨基酸含量，mg/100g(mL)；

A_1 ——样品氨基酸峰面积；

A_2 ——标准氨基酸峰面积；

c ——氨基酸标准液浓度(μmol/mL)；

M_r ——该氨基酸的相对分子质量；

V ——水解后定容体积 mL；

m ——样品质量 g(mL)；

D ——稀释倍数；

1000——μg 换算成 mg。

8. 注意事项

（1）本法以 OPA/3－MPA 与一级氨基酸在 pH10.4 的介质中生成有较强荧光和紫外吸收的异吲哚衍生物，但 OPA 不能与二级氨基酸（如脯氨酸）反应，因此，如果同时测定二级氨基酸时，可在 OPA 与一级氨基酸反应完成后，加入 FMOC－CL 与二级氨基酸反应，过量的 OPA 不出峰，过量的 FMOC－CL 及其分解产物的出峰时间在最后被洗脱出的二级氨基酸之后，不干扰测定。因 2 个衍生反应速度迅速，反应完全，可实现在线自动衍生。

（2）本法用普通的反相柱就可分离氨基酸的 OPA 衍生物，所以较柱后衍生法有分析时间短，分离效果和重现性好，操作简便及酸水解后省去了除酸处理步骤的优点。由于样品溶液的离子强度及盐类对衍生和分离没有影响，所以样品酸水解后只要稀释成合适的浓度或酸度就可直接进样测定。如用 10mL 6mol HCl 酸水解后用水定容至 100mL，取 5mL 稀释至 25mL。其酸度约为 $10\times6\div500=0.12$mol/mL 与市售氨基酸混合标准液的酸度 0.1mol/mL 相近，精滤后可直接进样测定而省去了常规操作中用电热减压蒸发器作除酸处理的繁琐步骤。

（3）本法关键是蛋白质的衍生浓度和衍生时间，在 1μL 0.250μmol/mL 的标准加 1μL OPA 试剂进行反应的条件下，OPA 过量约 15 倍，在具体操作时应控制样品浓度。保证 OPA 试剂过量 10 倍以上，另 OPA 与氨基酸的最佳反应 pH 为 10.4，反应产物在 2min 时达到最大值，2min 后氨基酸的衍生产率会有不同程度的下降，因此应严格控制反应时间，最好用自动进样器在线自动衍生，如用手动衍生时力求分秒不差，以获得良好的重现性。

（4）配制 12.5mmol/L 磷酸盐缓冲液时，准确称量磷酸氢二钠及磷酸二氢钠即可达到所需要的 pH（pH7.2），一般不需再用 NaOH 或 HCl 调节，但每次改用新的一批试剂时，应用酸度计测量进行验证。

（5）本法应选用 3μm 或 5μm 柱效高的色谱柱，如柱效下降，某些氨基酸（主要是苏氨酸与组氨酸；缬氨酸与甲硫氨酸）分离较差，故也可用苏氨酸与组氨酸的分离度来判断柱效的性能高低，如更换新柱或溶剂，应再用标准液来定位，因苏氨酸与组氨酸的峰位有可能会互换。

另流动相 A 中的四氢呋喃（THF）浓度对氨基酸的分离也有很大影响，其浓度可在 0.1%～0.5%之间变动，如苏氨酸与组氨酸或缬氨酸与甲硫氨酸的分离度下降，可适当调整 THF 的浓度以达到最佳的分离效果。柱温应控制在（40±1）℃，因＜35℃，分离变差，峰形变坏。

（6）OPA 与 3－MPA（巯基丙酸）或 β－MCE（巯基乙醇）联用，在有巯基的存在下 OPA 才参与衍生反应，但 OPA/3－MPA 与氨基酸的衍生物在稳定性及反相柱中的分离度都比 β－MCE 好，所以如手动衍生时，更应选用 3－MPA，另由于 3－MPA 的加入，使异吲哚衍生物的疏水性降低，能更好地控制氨基酸的

出峰时间，使过量的FMOC及其分解产物的出峰时间在最后被洗脱出的二级氨基酸之后，而不干扰分析结果。

（7）用带自动进样器的HPLC自动衍生：普通的自动进样器应稍做改装使具备有在线衍生功能，并按以下操作设置吸试剂（样品）、加试剂（样品）、洗吸样针、混合次数及时间程序：吸pH10.4的四硼酸钠缓冲液2μL→洗针→吸2μL OPA→洗针→吸1μL标准混合液（0.25μmol/mL）或样品→并混合10次→洗针→等待→吸1μL FMOC－CL（从第一次开始混合至此步精确计时2min）→并混合10次→等待→INJECT（从加入FMOC－CL后至INJECT精确计时2min）。

（8）梯度程序说明：

0～25←——　min　为分析程序，氨基酸在25min内全部出峰完毕。

25～35←——　min　用100%B以冲洗柱上的残留杂质。

35.1～45←——　min　用100%A平衡色谱柱，以待下一次分析。

如使用250nm×4.0mm或250nm×4.6mm的C_{18}色谱柱，梯度洗脱程序为：

时间/min	A/%	B/%
0	100	0
45	0	100
60	0	100
60.1	100	0
75	100	0

（9）波长转换时间是从赖氨酸→脯氨酸，以赖氨酸出峰之后，脯氨酸出峰之前为准。

（10）标准曲线的校正：每季度或大批检样时，应做一次5点（0.50、0.10、0.15、0.20、0.25μmol/mL）标准曲线对仪器进行校正，在日常工作中可采用一点法校准或每隔10个样品做一个标准或质控样进行质量控制，本法线性良好，相关系数均可达0.999以上。

（11）本法赖氨酸出2个峰可能是因为赖氨酸有2个氨基而形成2种衍生物的缘故，但2个峰的峰面积与赖氨酸的进样量均有良好的线性关系，故可用总的峰面积或取其中的某一个峰面积定量。

（12）本法不能定量胱氨酸，因胱氨酸结构中有巯基会受OPA试剂中的巯基丙酸干扰。

（13）本法同样适用于其他氨基酸如牛磺酸及生理型的氨基酸测定。

（五）柱后衍生法

1．原理

HPLC－OPA柱后衍生离子交换高效液相色谱法　样品中的蛋白质经盐酸水解成游离氨基酸，经氨基酸分析专用柱（钠型离子交换柱），在流动相的梯度洗脱下，因流动相的pH逐渐增高，氨基酸逐渐失去正电荷，与离子交换树脂的结合逐渐减弱，最后便从树脂被洗脱下来，由于各种氨基酸的结构不一样，酸碱度不一样，极性、分子质量不一样，电荷变化也不一样，因此对树脂的亲和力就不一样，从而达到分离的目的，分离后的氨基酸再由次氯酸把二级胺氧化成一级胺，用OPA进行衍生，荧光检测定量。

2．适用范围

本方法最低检出限10pmol。

3．仪器

（1）WATERS HPLC带510泵，柱后反应泵，420荧光检测器，680梯度控制器，数据处理机，柱加温器。

（2）20mL空安瓿瓶或具螺口的硬质试管。

（3）高纯氮气。

（4）pH计。

（5）冷冻离心机及超滤设备。

（6）电热减压蒸发器。

4．试剂

试剂为G.R.或A.R.级，水为三蒸水经Milli－Q超纯处理。

（1）缓冲液A：称取柠檬酸三钠二水化合物19.60g，苯酚（重蒸馏）1.0g，加水800mL溶解，用HNO_3调节pH至3.10，再用水稀释至1000mL，用0.45μm滤膜过滤后备用。

（2）缓冲液B：称取H_3BO_3 1.50g，$NaNO_3$ 21.00g，加水800mL溶解，用6 mol/L NaOH调节pH至9.60，再用水稀释至1000mL用0.45μm滤膜过滤后备用。

以上两种缓冲液在室温下可稳定一周。

（3）0.5mol/L K_3BO_3保存液：称取H_3BO_3 123.6g及KOH 102g溶解在3.5L水中，再用NaOH溶液调节pH为10.4，再用水稀释至4L，用0.45μm滤膜过滤后备用。此溶剂可稳定数月。

（4）次氯酸钠溶液：1L0.5mol/L K_3PO_4保存液中加入2mL5%的次氯酸钠溶液及1mL30%Brij35（聚乙烯醇醚）（界面活性剂）水溶液混合。

（5）OPA溶液：称取700mg OPA及2mL二巯基乙醇溶解在10mL甲醇中，并加入1L0.5mol/L硼酸钾保存液及1mL30%Brij35水溶液混合。

(6) 氨基酸混合标准液(H 型):2.5μmol/mL(日本和光纯药工业株式会社)。

5. 色谱条件

(1) 色谱柱:WATERS 氨基酸分析专用柱(250×4.6)mm。

(2) 荧光检测波长:(激发波长 338×发射波长 425)nm。

(3) 柱温:62℃。

(4) 衰减:2。

(5) 进样量:10~20μL。

(6) 流速:0.4mL/min;柱后泵:0.4mL/min。

(7) 梯度程序:

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0	0.4	100	0
48	0.4	0	100
75	0.4	0	100
76	0.4	100	0
105	0.4	100	0

6. 样品处理

取含蛋白质 10~20mg 的样品同上法充氮处理,并加 6mol/L HCl 10mL 及几滴新蒸馏的苯酚,于 110℃ ×22h 酸水解后,冷却,将水解液经滤纸过滤到 50mL 容量瓶中,用超纯水淋洗酸水解管及滤纸并定容,取样液 1.0mL 于小试管中,置减压蒸发器内在 35℃ 中减压蒸干,用 1.0mL 缓冲液 A 溶解,为了除去水解样品中的高分子蛋白质、类脂质等杂质干扰,用 sep-pak C_{18}小柱处理。

7. 操作步骤

(1) 连接 HPLC 各部件装置,柱加温器 62℃,柱后泵流速 0.4mL/min,用缓冲液 A 平衡柱子,最好用一个梯度程序冲洗柱子,然后分别注入标准及样品液。

(2) 标准溶液的检测及出峰顺序:

用缓冲液 A 将标准液稀释 10 倍进样测定。

出峰顺序:以 18 种氨基酸为例:天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、色氨酸、赖氨酸、精氨酸(图 3-4)。

8. 计算

同上法。

9. 注意事项

(1) 本法为柱后衍生的离子交换色谱法,样品须除酸处理,缓冲液的 pH 精度要求较高,应准确到小数后两位,一般控制在第一个天冬氨酸的出峰时间15～18min 为宜。

(2) 柱后衍生剂要鲜配,应用高纯度试剂和超纯水可使游离氨峰变小,如溶剂不佳或样品不洁可使游离氨峰变大甚至出现平顶峰时,精氨酸的出峰时间会推迟,并在 81～85min 之间变异,但只要精氨酸峰能与氨峰分开,对定量无影响。

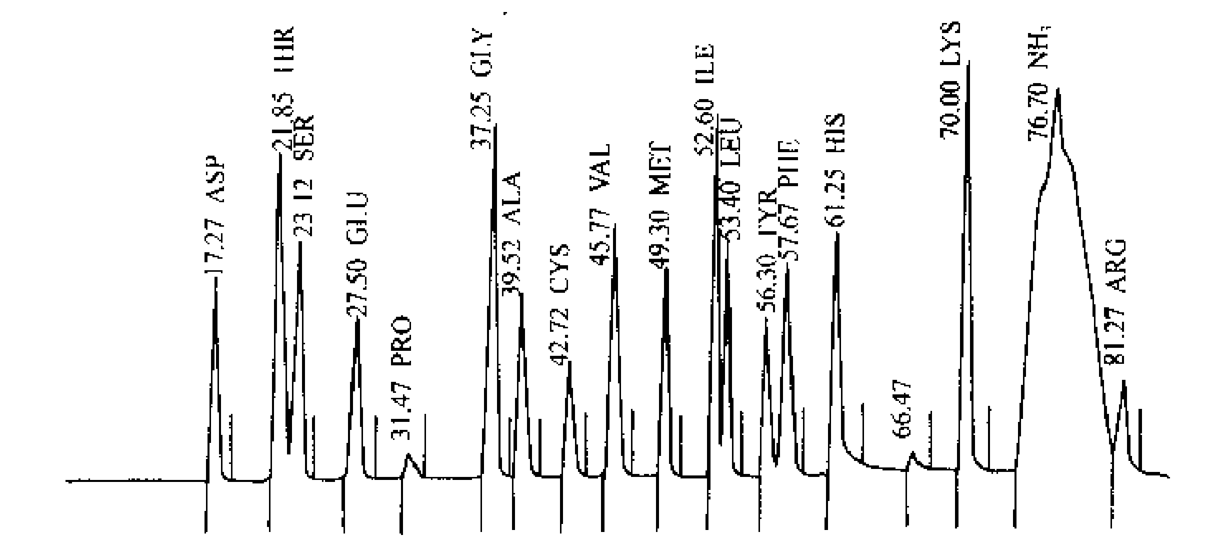


图 3-4　出峰顺序图
(本图缺色氨酸)

(3) 同一样品用本法与日立 KLA-5 型氨基酸分析仪的茚三酮法比较,结果没有显著性差异($0.05<P<0.1$),方法重现性良好,17 种氨基酸的保留时间及峰面积的变异系数(C.V%)在 0.20%～2.04%及 1.3%～5.5%之间。

(4) 本法也可用紫外检测。

(5) 含有蛋白质、类脂质、重金属的样品可用 sep-pak C_{18}小柱处理:

① 用 10mL 甲醇通过 sep-pak C_{18}小柱 2 次,使柱子活化。

② 用 10mL0.1%TFA(三氟醋酸)水溶液洗柱子 2 次。

③ 用 10mL0.1%TFA 溶液(20%的甲醇溶液)洗柱子。

④ 把 1.0mL 样品与 1～2mL0.1%TFA(30%的甲醇溶液)混合均匀。

⑤ 把上液通过 sep-pak C_{18}小柱。

⑥ 弃初出液 1mL,收集后流出液为样液。

第二节　碳水化合物的测定方法

碳水化合物是由 C、H、O 组成的有机物,其基本结构式为 $C_m(H_2O)_n$。从化

学结构上讲，碳水化合物是多羧基醛和多羧基酮的环状半缩醛及其缩合产物。根据分子结合的多寡可把碳水化合物分为单糖、寡糖、低聚糖和多糖。关于碳水化合物的测定方法主要有化学法、酶法和 HPLC 法。根据测定目的及样品中碳水化合物性质、组成与含量确定检测方法。对常量含糖物质可选用比色法、滴定法，操作较为简单，价格低廉，反应灵敏，是目前国际上通用的方法，缺点是特异性较差。酶法以特异的碳水化合物为底物，引发一系列反应，通过测定反应产物可以定量地分析碳水化合物的含量。酶法灵敏，特异性高，但是价格相对昂贵。HPLC 法根据待检物质的性质，选用不同的糖柱作为分离柱，用示差检测器进行定量分析，是近年来发展比较迅速的方法。

由于碳水化合物组成的形式千差万别，产生的化合物种类繁多，所以对碳水化合物的测定带来一定困难。这里仅介绍常用的一些检测方法。

一、总碳水化合物

总碳水化合物的测定方法主要有两种，一种是差减法，即：

碳水化合物(%)＝100－(蛋白质＋脂肪＋水分＋灰分＋膳食纤维)

另一种方法是加和法，即：

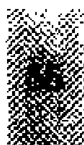
碳水化合物(%)＝各类碳水化合物之和(包括单糖、寡糖、低聚糖、多糖等)

差减法的结果中包括一些植物细胞壁等非碳水化合物组分，并且包括了每种营养成分检测方法本身的误差。FAO 建议不用此法计算总碳水化合物，但是由于操作方法简单，目前多数国家仍沿用此法。相对于差减法，加和法更准确，但是由于多种碳水化合物的测定方法仍是目前检测工作中的难题，所以此法应用起来尚有一定困难。

二、葡萄糖的测定——葡萄糖氧化酶法

葡萄糖是生物界一种重要的单糖，其结构是六碳呋喃糖，分子式为$C_6H_{12}O_6$，相对分子质量为 180.1。葡萄糖为结晶固体，具有吸湿性，易溶于水，微溶于乙醇，不溶于有机溶剂，具有旋光性和还原性。葡萄糖可被碘氧化，高温及强酸可使葡萄糖分解破坏，发生焦糖化作用。在自然界中只有少数的天然食物含有游离的葡萄糖，如葡萄，但是蔗糖、乳糖、淀粉等碳水化合物的水解物中含有葡萄糖。在一些加工食品中也可含有葡萄糖。

葡萄糖的测定方法主要有化学法、酶法和高效液相法。葡萄糖具有还原性，可选择还原糖法的测定方法测定，但是还原糖法特异性较差，如果样品中混有其他还原糖可使结果偏高。酶法采用的酶可选择性地水解葡萄糖，方法的特异性较强，是测定葡萄糖，包括血糖常选用的方法。常用的酶法有葡萄糖氧化酶法和



己糖激酶法，这里介绍葡萄糖氧化酶法。

1．原理

葡萄糖在葡萄糖氧化酶的作用下产生葡萄糖酸和过氧化氢，过氧化氢在过氧化物酶的作用下使邻联甲苯胺生成蓝色物质，此有色物质在 625nm 波长下与葡萄糖浓度成正比。通过测定蓝色物质的吸光度值可计算样品中葡萄糖的含量。

2．适用范围

适用于谷类、乳类、饮料、酒类等食物样品和血液样品。检出量为 0.02mg。

3．仪器

722 型分光光度计。

4．试剂

除特殊说明外，实验用水为蒸馏水，试剂为分析纯。

(1) 无水乙醇。

(2) 40%三氯乙酸：称取 40g 三氯乙酸，用水溶解并稀释至 100mL。

(3) 2mol/L NaOH 溶液：称取 8g NaOH，用水溶解并稀释至 100mL。

(4) 1%邻联甲苯胺溶液：称取 0.1g 邻联甲苯胺溶解于 10mL 无水乙醇中，倒入棕色瓶中，4℃冰箱保存。

(5) 乙酸缓冲液(pH 5.0)：称取 14.28g 乙酸钠($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)溶于水中，加入 2.7mL 冰乙酸，并调节 pH5.0，用水定容至 1L。

(6) 葡萄糖氧化酶溶液：称取一定量的葡萄糖氧化酶(Sigma 公司)用水溶解，使酶含量为 100U/mL。4℃冰箱保存一周。

(7) 过氧化物酶溶液：0.010g 辣根过氧化物酶溶于 10mL 水中，4℃冰箱保存一周。

(8) 酶溶液：取 100mL 乙酸缓冲液，分别加入邻联甲苯胺溶液、葡萄糖氧化酶溶液、过氧化物酶溶液各 1mL，混匀。4℃冰箱可保存 7 周。

(9) 酶空白液：取 100mL 乙酸缓冲液，分别加入邻联甲苯胺溶液、过氧化物酶溶液各 1 mL，混匀。4℃冰箱保存 1 周。(注意酶空白液中不含葡萄糖氧化酶)。

(10) 葡萄糖标准液：将葡萄糖标准品(纯度大于 99%)于 80℃干燥至恒量。精确称取 0.050g，用水移入 100mL 容量瓶中，定容至刻度线。相当于浓度为 0.5mg/mL。

5．操作步骤

(1) 样品处理：

① 固体样品：称取 0.5～5g 已粉碎的样品于锥形瓶中，加入 50mL 水后沸水浴 15min。冷却后，转移至 100mL 容量瓶中并用水定容至刻度。反复摇动混匀样品，过滤，弃初始几滴滤液。收集滤液。如果滤液澄清，可直接或经进一步

稀释后用于测定。如果滤液浑浊，吸取20mL滤液转移至另一容量瓶中，加入无水乙醇至刻度。混合后静置至少30min。过滤，滤液用于测定。

② 液体样品或寡糖、淀粉等碳水化合物水解液：吸取2～10mL样品或水解液，加入4倍量无水乙醇（使乙醇终浓度为80%），混合。静置至少30min，过滤后滤液备用。（如果过滤后滤液仍浑浊，或样液体积过少，可3000r/min离心15 min，上清液备用。）

③ 新鲜牛乳等样品：吸取0.5～2mL样品，用水稀释，加入3mL40%三氯乙酸溶液。用水定容至100mL，过滤。吸取5mL滤液，用2mol/L NaOH调节pH至中性，用水定容至10mL，备用。

[注：样品处理中80%乙醇的用途是沉淀不溶性多糖和部分蛋白质，40%三氯乙酸用于沉淀蛋白]

(2) 测定：标准管和样品测定管，按下表所列操作（单位：mL）。

试　剂	标准空白管	葡萄糖标准管	样品空白管	样品测定管
葡萄糖标准液	—	0.1～0.5	—	—
样品提取液	—	—	0.5	0 5
水	0.5	补至0.5	—	—
酶溶液	5	5	—	5
酶空白液	—	—	5	—

将上述试剂混合后37℃水浴反应15min，625nm测定吸光度值。

[注意：葡萄糖与酶溶液的成色反应与反应时间密切相关，如反应时间过长，溶液颜色会由蓝转变成灰色，并慢慢产生沉淀，所以反应时间应严格控制好]

6．计算

根据吸光度值求出葡萄糖标准曲线的回归方程，采用插入法求出样品测定管中葡萄糖含量，再根据稀释定容体积和称样量，计算出样品中葡萄糖含量。

$$w = \frac{(m_s - m_b) \times V \times f}{0.5 \times m} \times 0.1$$

式中　w ——样品中葡萄糖含量，g/100g；

m_s —— 由标准回归方程求出的样品测定管中葡萄糖含量，mg；

m_b ——由标准回归方程求出的样品空白管中葡萄糖含量，mg；

V ——样品定容体积，mL；

f ——稀释倍数；

0.5 ——测定时吸取样品提取液的体积，mL；

m ——样品质量，g；

0.1 ——将mg/g转换成g/100g的系数。

7．注意事项

(1) 此方法中的酶溶液只能和葡萄糖反应，特异性强，灵敏度高。



（2）如果样品提取液为无色，无需做样品空白。但是有些样品颜色很深，如饮料、菌藻类食物，或样品提取液浑浊，往往干扰测定结果但又难以去除，所以测定这类样品时需做样品空白管以减少干扰。

三、还原糖的测定方法

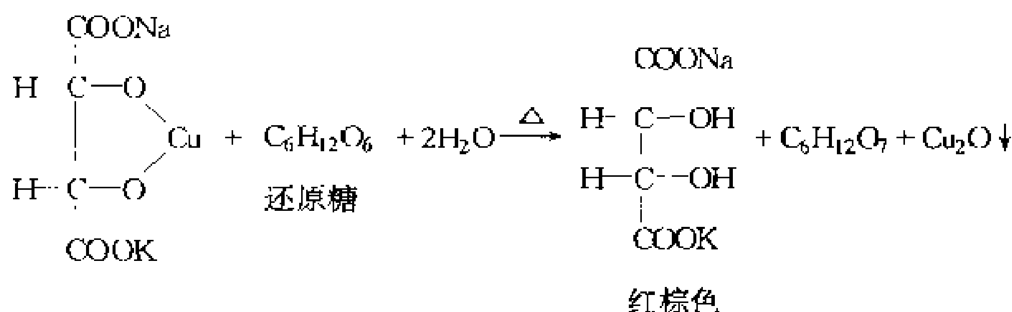
含有醛基或酮基的糖，在碱性条件下可转变成非常活泼的烯二醇结构，被弱氧化剂氧化生成相应的糖酸，所以这类糖具有一定还原性。凡是具有还原性的糖被称为还原糖。单糖均是还原糖，二糖中乳糖、麦芽糖也具有还原性。根据还原糖的这一特性，应用含有碱性弱氧化剂的班氏液、费林氏液可以测定食物中还原糖的含量。

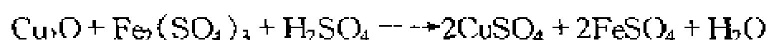
（一）高锰酸钾滴定法

1. 原理

样品经除去蛋白质后，其中还原糖在碱性环境下将铜盐还原为氧化亚铜，加硫酸铁后，氧化亚铜被氧化为铜盐，以高锰酸钾溶液滴定氧化作用后生成的亚铁盐，根据高锰酸钾消耗量计算氧化亚铜含量，再查表得还原糖量。

反应式如下：





$$Cu_2O + Fe_2(SO_4)_3 + H_2SO_4 \longrightarrow 2CuSO_4 + 2FeSO_4 + H_2O$$



$$10FeSO_4 + 2KMnO_4 + 8H_2SO_4 \longrightarrow 5Fe_2(SO_4)_3 + 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 8H_2O$$

2. 适用范围

参照 GB 5009.7—85，本法适用于所有食品中还原糖的测定以及通过酸水解或酶水解转化成还原糖的非还原性糖类物质的测定。

3. 仪器

（1）滴定管。

（2）25mL 古氏坩埚或 G_4 垂融坩埚。

（3）真空泵。

（4）水浴锅。

4. 试剂

除特殊说明外，实验用水为蒸馏水，试剂为分析纯。

（1）6mol/L HCl：量取50mL盐酸加水稀释至100mL。

（2）甲基红指示剂：称取10mg甲基红，用100mL乙醇溶解。

（3）5mol/L NaOH溶液：称取20g氢氧化钠加水溶解并稀释至100mL。

（4）碱性酒石酸铜甲液：称取34.639g硫酸铜（$CuSO_4 \cdot 5H_2O$），加适量水溶解，加0.5mL硫酸，再加水稀释至500mL，用精制石棉过滤。

（5）碱性酒石酸铜乙液：称取173g酒石酸钾钠与50g氢氧化钠，加适量水溶解，并稀释至500mL，用精制石棉过滤，贮存于橡胶塞玻璃瓶中。

（6）精制石棉：取石棉先用3mol/L HCl浸泡2～3d，用水洗净，再加2.5mol/L NaOH溶液浸泡2～3d，倾去溶液，再用热碱性酒石酸铜乙液浸泡数小时，用水洗净。再以3mol/L HCl浸泡数小时，以水洗至不呈酸性。然后加水振摇，使成微细的浆状软纤维，用水浸泡并贮存于玻璃瓶中，即可用做填充古氏坩埚用。

（7）0.1000mol/L $\frac{1}{5}KMnO_4$ 标准溶液。

（8）1mol/L NaOH溶液：称取4g氢氧化钠，加水溶解并稀释至100mL。

（9）硫酸铁溶液$\left[\frac{1}{6}Fe_2(SO_4)_3\right]$：称取50g硫酸铁，加入200mL水溶解后，慢慢加入100mL硫酸，冷却后加水稀释至1L。

（10）3mol/L HCl：量取30mL盐酸，加水稀释至120mL。

5. 操作方法

（1）样品处理：

① 乳类、乳制品及含蛋白质的食品：称取约0.5～2g固体样品（吸取2～10mL液体样品），置于250mL容量瓶中，加50mL水，摇匀。加入10mL碱性酒石酸铜甲液及4mL1mol/L NaOH溶液，加水至刻度，混匀。静置30min，用干燥滤纸过滤，弃去初滤液，滤液备用[注意：此步骤目的是沉淀蛋白质]。

② 酒精性饮料：吸取100mL样品，置于蒸发皿中，用1mol/L NaOH溶液中和至中性，在水浴上蒸发至原体积1/4后[注意：如果蒸发时间过长，应注意保持溶液pH为中性]，移入250mL容量瓶中。加50mL水，混匀。以下按①自"加入10mL碱性酒石酸铜甲液"起依法操作。

③ 含多量淀粉的食品：称取2～10g样品，置于250mL容量瓶中，加200mL水，在45℃水浴中加热1h，并时时振摇[注意：此步骤是使还原糖溶于水中，切忌温度过高，因为淀粉在高温条件下可糊化、水解，影响检测结果]。冷却后加水至刻度，混匀，静置。吸取200 mL上清液于另一250mL容量瓶中，以下按①自"加入10mL碱性酒石酸铜甲液"起依法操作。

④ 含有脂肪的食品：称取2～10g样品，先用乙醚或石油醚淋洗3次，去除醚层。加入50mL水混匀，以下按①自"加入10mL碱性酒石酸铜甲液"起依法操作。



⑤ 汽水等含有二氧化碳的饮料：吸取 100mL 样品置于蒸发皿中，在水浴上除去二氧化碳后，移入 250mL 容量瓶中，并用水洗涤蒸发皿，洗液并入容量瓶中，再加水至刻度，混匀后，备用。

(2) 样品测定：吸取 50mL 处理后的样品溶液，于 400mL 烧杯中，加入 25mL 碱性酒石酸铜甲液及 25mL 乙液，于烧杯上盖一表面皿，加热，控制在 4min 内沸腾，再准确煮沸 2min，趁热用铺好石棉的古氏坩埚或 G_4 垂融坩埚抽滤，并用 60℃ 热水洗涤烧杯及沉淀，至洗液不呈碱性为止。将古氏坩埚或垂融坩埚放回原 400mL 烧杯中，加 25mL 硫酸铁溶液及 25mL 水，用玻棒搅拌使氧化亚铜完全溶解，以 0.1000mol/L $1/5KMnO_4$ 标准液滴定至微红色为终点[注意：还原糖与碱性酒石酸铜试剂的反应一定要在沸腾状态下进行，沸腾时间需严格控制。煮沸的溶液应保持蓝色，如果蓝色消失，说明还原糖含量过高，应将样品溶液稀释后重做]。

同时吸取 50mL 水，加与测样品时相同量的碱性酒石酸铜甲、乙液，硫酸铁溶液及水，按同一方法做试剂空白实验。

6. 计算

$$m_1 = (V - V_0) \times c \times 71.54 \qquad (1)$$

式中 m_1——样品中还原糖质量相当于氧化亚铜的质量，mg；

V——测定用样品液消耗高锰酸钾标准液的体积，mL；

V_0——试剂空白消耗高锰酸钾标准液的体积，mL；

c——$\frac{1}{5}KMnO_4$ 标准溶液的浓度，mol/L；

71.54——$\frac{1}{2}Cu_2O$ 的摩尔质量，g/mol。

根据(1)式中计算所得氧化亚铜质量，查附表“氧化亚铜质量相当于葡萄糖、果糖、乳糖、转化糖的质量表”，再计算样品中还原糖含量。

$$m_2 = \frac{m_3 \times V_2}{m_4 \times V_1} \times \frac{100}{1000} \qquad (2)$$

式中 m_2——样品中还原糖的含量，g/100g(g/100mL)；

m_3——查表得还原糖质量，mg；

m_4——样品质量(或体积)，g(mL)；

V_1——测定用样品处理液的体积，mL；

V_2——样品处理后的总体积，mL。

7. 举例

称取某食物样品 3.00g，经过处理后用水定容至 250mL。取 50mL 进行测定，消耗 0.1003mol/L$\left(\frac{1}{5}KMnO_4\right)$标准液 5.20mL，同时测试剂空白为 0.36mL，则样品中还原糖质量相当于氧化亚铜的质量为：

$$m_1 = (5.20 - 0.36) \times 0.1003 \times 71.54 = 34.73(\text{mg})$$

查表得还原糖质量为相当于葡萄糖 16.22 mg,样品中还原糖含量(以葡萄糖计)为:

$$m_2 = \frac{16.22 \times 250}{3.00 \times 50} \times \frac{100}{1000} = 2.70(\text{g}/100\text{g})$$

8. 注意事项

本法用碱性酒石酸铜溶液作为氧化剂。由于硫酸铜与氢氧化钠反应可生成氢氧化铜沉淀,氢氧化铜沉淀可被酒石酸钾钠缓慢还原,析出少量氧化亚铜沉淀,使氧化亚铜计量发生误差,所以甲、乙试剂要分别配制及贮藏,用时等量混合。

(二) 直接滴定法

1. 原理

样品经除去蛋白质后,在加热条件下,直接滴定已标定过的费林氏液,费林氏液被还原析出氧化亚铜后,过量的还原糖立即将次甲基蓝(指示剂)还原,使蓝色退色。根据样品消耗体积,计算还原糖量。

2. 适用范围

参照 GB 5009.7—85,本法适于所有食品中还原糖的检测。检出限 0.1mg。

3. 主要仪器

滴定管。

4. 试剂

除特殊说明外,实验用水为蒸馏水,试剂为分析纯。

(1) 费林氏甲液:称取 15g 硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)及 0.05g 次甲基蓝,溶于水中并稀释至 1L。

(2) 费林氏乙液:称取 50g 酒石酸钾钠与 75g 氢氧化钠,溶于水中,再加入 4g 亚铁氰化钾,完全溶解后,用水稀释至 1000mL,贮存于橡胶塞玻璃瓶内。

(3) 乙酸锌溶液:称取 21.9g 乙酸锌,加 3mL 冰乙酸,加水溶解并稀释至 100mL。

(4) 亚铁氰化钾溶液:称取 10.6g 亚铁氰化钾,用水溶解并稀释至 100mL。

(5) 盐酸(HCl)。

(6) 葡萄糖标准溶液:精密称取 1.000g 经过 80℃ 干燥至恒重的葡萄糖(纯度在 99% 以上),加水溶解后加入 5mL 盐酸,并以水稀释至 1L。此溶液相当于 1mg/mL 葡萄糖[注意:加盐酸的目的是防腐,标准溶液也可用饱和苯甲酸溶液配制]。

5. 操作方法

(1) 样品处理:

① 乳类、乳制品及含蛋白质的食品：称取约 0.5～2g 固体样品(吸取 2～10mL 液体样品)，置于 100mL 容量瓶中，加 50mL 水，摇匀。边摇边慢慢加入 5mL 乙酸锌溶液及 5mL 亚铁氰化钾溶液，加水至刻度，混匀。静置 30 min，用干燥滤纸过滤，弃去初滤液，滤液备用[注意：乙酸锌可去除蛋白质、鞣质、树脂等，使它们形成沉淀，经过滤除去。如果钙离子过多时，易与葡萄糖、果糖生成络合物，使滴定速度缓慢，从而结果偏低，可向样品中加入草酸粉，与钙结合，形成沉淀并过滤]。

② 酒精性饮料：吸取 50mL 样品，置于蒸发皿中，用 1mol/L 氢氧化钠溶液中和至中性，在水浴上蒸发至原体积 1/4 后，移入 100mL 容量瓶中。加 25mL 水，混匀。以下按①自"加入 5mL 乙酸锌溶液"起依法操作。

③ 含多量淀粉的食品：称取 2～5g 样品，置于 100mL 容量瓶中，加 50mL 水，在 45℃ 水浴中加热 1h，并时时振摇[注意：此步骤是使还原糖溶于水中，切忌温度过高，因为淀粉在高温条件下可糊化、水解，影响检测结果]。冷后加水至刻度，混匀，静置。吸取 50mL 上清液于另一 100mL 容量瓶中，以下按①自"加入 5mL 乙酸锌溶液"起依法操作。

④ 汽水等含有二氧化碳的饮料：吸取 50mL 样品置于蒸发皿中，在水浴上除去二氧化碳后，移入 100mL 容量瓶中，并用水洗涤蒸发皿，洗液并入容量瓶中，再加水至刻度，混匀后，备用[注意：样液中还原糖最终浓度应接近于葡萄糖标准液的浓度]。

(2) 标定费林氏液溶液：吸取 5.0mL 费林氏甲液及 5.0mL 乙液，置于 150mL 锥形瓶中[注意：甲液与乙液混合可生成氧化亚铜沉淀，应将甲液加入乙液，使开始生成的氧化亚铜沉淀重溶]，加水 10mL，加入玻璃珠 2 粒，从滴定管滴加约 9mL 葡萄糖标准溶液，控制在 2min 内加热至沸，趁沸以每 2s 1 滴的速度继续滴加葡萄糖标准溶液，直至溶液蓝色刚好退去并出现淡黄色为终点，记录消耗的葡萄糖标准溶液总体积，平行操作 3 份，取其平均值，计算每 10mL(甲、乙液各 5mL)费林氏液相当于葡萄糖的质量(mg)[注意：还原的次甲基蓝易被空气中的氧氧化，恢复成原来的蓝色，所以滴定过程中必须保持溶液成沸腾状态，并且避免滴定时间过长]。

(3) 样品溶液预测：吸取 5.0mL 费林氏甲液及 5.0mL 乙液，置于 150mL 锥形瓶中，加水 10mL，加入玻璃珠 2 粒，控制在 2min 内加热至沸，趁沸以先快后慢的速度，从滴定管中滴加样品溶液，并保持溶液沸腾状态，待溶液颜色变浅时，以每秒 1 滴的速度滴定，直至溶液蓝色退去，出现亮黄色为终点。如果样品液颜色较深，滴定终点则为蓝色退去出现明亮颜色(如亮红)，记录消耗样液的总体积[注意：如果滴定后样品液的颜色变浅后复又变深，说明滴定过量，需重新滴定]。

(4) 样品溶液测定：吸取 5.0mL 费林氏甲液及 5.0mL 乙液，置于 150mL 锥形瓶中，加水 10mL，加入玻璃珠 2 粒，在 2min 内加热至沸，快速从滴定管中滴加比预测体积少 1mL 的样品溶液，然后趁沸继续以每 2s 1 滴的速度滴定直至终点。记



录消耗样液的总体积,同法平行操作 2～3 份,得出平均消耗体积。

6. 计算

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V}{m \times V_2 \times 1000} \times 100$$

式中 w ——样品中还原糖的含量(以葡萄糖计),%;

ρ ——葡萄糖标准溶液的浓度,mg/mL;

V_1 ——滴定 10mL 费林氏溶液(甲、乙液各 5mL)消耗葡萄糖标准溶液的体积,mL;

V_2 ——测定时平均消耗样品溶液的体积,mL;

V ——样品定容体积,mL;

m ——样品质量,g。

7. 注意事项

(1) 本方法测定的是一类具有还原性质的糖,包括葡萄糖、果糖、乳糖、麦芽糖等,只是结果用葡萄糖或其他转化糖的方式表示,所以不能误解为还原糖 = 葡萄糖或其他糖。但如果已知样品中只含有某一种糖,如乳制品中的乳糖,则可以认为还原糖 = 某糖。

(2) 分别用葡萄糖、果糖、乳糖、麦芽糖标准品配制标准溶液滴定等量同一费林氏液,所消耗标准溶液的体积有所不同。证明即便同是还原糖,在物化性质上仍有所差别,所以还原糖的结果只是反映样品整体情况,并不完全等于各还原糖含量之和。如果已知样品只含有某种还原糖,则应以该还原糖作标准品,结果为该还原糖的含量。如果样品中还原糖的成分未知,或为多种还原糖的混合物,则以某种还原糖作标准品,结果以该还原糖计,但不代表该糖的真实含量。

四、蔗糖的测定方法

蔗糖是由一分子葡萄糖和一分子果糖缩合而成,分子式为 $C_{12}H_{22}O_{11}$,具有易溶于水,微溶于乙醇,不溶于醚的物理特性。

目前国标方法(GB 5009.8—85)甚至国际通用方法中对蔗糖的测定方法仍然是采用还原糖的测定方法。蔗糖本身并不具有还原性,但在酸水解条件下蔗糖可分解成两个具有还原性的单糖(葡萄糖和果糖),即可按还原糖测定方法测定水解前后还原糖含量,其差值为蔗糖含量。由于一些小分子低聚糖在样品提取过程中可同时被提取出来,所以此法测定的结果中包括部分小分子糖的含量。

1. 原理

样品经除去蛋白质后,蔗糖经盐酸水解转化为还原糖,再按还原糖测定。水解前后还原糖的差值为蔗糖含量。



2. 适用范围

本方法适合于所有食物样品中蔗糖的检测(GB 5009.8—85)。

3. 仪器

(1) 滴定管。

(2) 25mL古氏坩埚或G_4垂融坩埚。

(3) 真空泵。

(4) 水浴锅。

4. 试剂

除特殊说明外,实验用水为蒸馏水,试剂为分析纯。

(1) 6mol/L HCl:量取50mL盐酸加水稀释至100mL。

(2) 甲基红指示剂:称取100mg甲基红,用100mL乙醇溶解。

(3) 5mol/L NaOH溶液:称取20g氢氧化钠加水溶解并稀释至100mL。

(4) 碱性酒石酸铜甲液:称取34.639g硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$),加适量水溶解,加0.5mL硫酸,再加水稀释至500mL,用精制石棉过滤。

(5) 碱性酒石酸铜乙液:称取173g酒石酸钾钠与50g氢氧化钠,加适量水溶解,并稀释至500mL,用精制石棉过滤,贮存于橡胶塞玻璃瓶中。

(6) 精制石棉:取石棉先用3mol/L HCl浸泡2～3d,用水洗净,再加2.5mol/L NaOH溶液浸泡2～3d,倾去溶液,再用热碱性酒石酸铜乙液浸泡数小时,用水洗净。再以3 mol/L盐酸浸泡数小时,以水洗至不呈酸性。然后加水振摇,使成微细的浆状软纤维,用水浸泡并贮存于玻璃瓶中,即可用做填充古氏坩埚用。

(7) 0.1000mol/L $\frac{1}{5}KMnO_4$标准溶液。

(8) 1mol/L NaOH溶液:称取4g氢氧化钠,加水溶解并稀释至100mL。

(9) 硫酸铁溶液:称取50g硫酸铁,加入200mL水溶解后,慢慢加入100mL硫酸,冷却后加水稀释至1L。

(10) 3mol/L盐酸:量取30mL盐酸,加水稀释至120mL。

5. 操作方法

(1) 样品处理:

① 乳类、乳制品及含蛋白质的食品:称取约0.5～2g固体样品(吸取2～10mL液体样品),置于250mL容量瓶中,加50mL水,摇匀。加入10mL碱性酒石酸铜甲液及4mL1mol/L NaOH溶液,加水至刻度,混匀。静置30min,用干燥滤纸过滤,弃去初滤液,滤液备用。

② 酒精性饮料:吸取100mL样品,置于蒸发皿中,用1mol/L NaOH溶液中和至中性,在水浴上蒸发至原体积1/4后,移入250mL容量瓶中。加50mL水,混匀。以下按①自“加入10mL碱性酒石酸铜甲液”起依法操作。



③ 含多量淀粉的食品：称取 2～10g 样品，置于 250mL 容量瓶中，加 200mL 水，在 45℃水浴中加热 1h，并时时振摇［注意：此步骤是使还原糖溶于水中，切忌温度过高，因为淀粉在高温条件下可糊化、水解，影响检测结果］。冷却后加水至刻度，混匀，静置。吸取 200mL 上清液于另一 250mL 容量瓶中，以下按①自"加入 10mL 碱性酒石酸铜甲液"起依法操作。

④ 汽水等含有二氧化碳的饮料：吸取 100mL 样品置于蒸发皿中，在水浴上除去二氧化碳后，移入 250mL 容量瓶中，并用水洗涤蒸发皿，洗液并入容量瓶中，再加水至刻度，混匀后，备用。

（2）样品水解：吸取 2 份 50mL 样品处理液，置于 100mL 锥形瓶中，一份加入 5mL6mol/L 盐酸，在 68～70℃中水解 15min［注意：酸度、温度、时间对蔗糖水解影响很大。如果温度过高或时间过长，一些大分子糖也可被水解。实验证明，蔗糖要求的水解条件远比其他双糖为低，此条件下，其他还原性双糖不水解，也不破坏原有单糖。］。冷却后加 2 滴甲基红指示剂［注意：如果样品液颜色较深，可以用广泛 pH 试纸或外指示剂，如溴麝香草酚蓝］，用 5mol/L 氢氧化钠溶液中和至中性，转至容量瓶中，加水定容至 100mL，混匀。另一份直接加水稀释至 100mL。

（3）样品测定：吸取 50mL 样品溶液，于 400mL 烧杯中，加入 25mL 碱性酒石酸铜甲液及 25mL 乙液，于烧杯上盖一表面皿，加热，控制在 4min 内沸腾，再准确煮沸 2min，趁热用铺好石棉的古氏坩埚或 G_4 垂融坩埚抽滤，并用 60℃热水洗涤烧杯及沉淀，至洗液不呈碱性为止。将古氏坩埚或垂融坩埚放回 400mL 烧杯中，加 25 mL 硫酸铁溶液及 25mL 水，用玻棒搅拌使氧化亚铜完全溶解，以 0.1000mol/L 高锰酸钾标准液滴定至微红色为终点。

同时吸取 50mL 水，加与测样品时相同量的碱性酒石酸铜甲、乙液，硫酸铁溶液及水，按同一方法做试剂空白实验。

6. 计算

$$m_1 = (V - V_0) \times c \times 71.54 \qquad (1)$$

式中 m_1——样品中还原糖质量相当于氧化亚铜的质量，mg；

V——测定用样品液消耗高锰酸钾标准液的体积，mL；

V_0——试剂空白消耗高锰酸钾标准液的体积，mL；

c——$\frac{1}{5}KMnO_4$ 标准溶液的浓度，mol/L；

71.54——$\frac{1}{2}Cu_2O$ 的摩尔质量，g/mol。

根据(1)式中计算所得氧化亚铜质量，查附表"氧化亚铜质量相当于葡萄糖、果糖、乳糖、转化糖的质量表"，再计算样品中还原糖含量。

$$w = \frac{m_3 \times V_2}{m_4 \times V_1} \times \frac{100}{1000} \qquad (2)$$

式中 w ——样品中还原糖的含量,g/100g(g/100mL);

m_3 ——查表得还原糖质量,mg;

m_4 ——样品质量(或体积),g(mL);

V_1 ——测定用样品处理液的体积,mL;

V_2 ——样品处理后的总体积,mL。

$$w' = (w_2 - w_1) \times 0.95 \quad (3)$$

式中 w'——样品中蔗糖含量,%;

w_2 ——水解处理后还原糖的含量,%;

w_1 ——不经水解处理还原糖含量,%;

0.95 ——还原糖(以葡萄糖计)换算为蔗糖的系数。

五、淀粉的测定方法

淀粉由多个葡萄糖分子缩合而成,分子通式为($C_6H_{10}O_5$)$_n$。根据缩合时葡萄糖的数目,成苷键的方式和成链的形状,淀粉可分为直链淀粉和支链淀粉。食物中直链淀粉大约占20%,支链淀粉占80%左右。在水溶性方面,二者因结构不同而有所差异,直链淀粉的水溶性较差,支链淀粉因具有高度分支的开链结构,易接近水分子。淀粉不溶于醇、醚等有机溶剂。

在沸水浴加热条件下淀粉发生糊化,可被酸或淀粉酶水解,使之生成葡萄糖,然后采用还原糖的测定方法或葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖含量,再乘以换算系数可折合成淀粉含量。酸水解法速度较快,操作简便,可将淀粉一次性水解得到葡萄糖,是常采用的方法。但是酸水解淀粉的同时还可分解部分半纤维素,形成具有还原性质的单糖或类似还原糖类物质,如戊糖酸、糖脂类等,使结果偏高。酶法相对特异性较高,较为理想。

(一) 酶水解法

1. 原理

样品经除去脂肪及可溶性糖类后,其中淀粉用淀粉酶水解成双糖,再用盐酸将双糖水解成单糖,最后按还原糖测定,并折算成淀粉。

2. 适用范围

本方法适用于测定所有含淀粉的食物(GB 5009.9—85)。

3. 仪器

(1) 回流冷凝器。

(2) 水浴锅。

4. 试剂

除特殊说明外,实验用水为蒸馏水,试剂为分析纯。

(1) 乙醚。

(2) 0.5%淀粉酶溶液：称取淀粉酶(Sigma公司,E.C3.2.1.1)0.5g,加100mL水溶解,加入数滴甲苯或三氯甲烷,防止长霉,贮于冰箱中[注意：配成溶液的淀粉酶破坏很快,最好随用现配]。

(3) 碘溶液：称取3.6g碘化钾溶于20mL水中,加入1.3g碘,溶解后加水稀释至100mL。

(4) 85%乙醇。

(5) 其余试剂同“蔗糖测定方法”。

5. 操作方法

(1) 样品处理：称取2～5g样品,置于放有折叠滤纸的漏斗内,先用50mL乙醚分5次洗除脂肪[注意：如果脂肪含量少,此步骤可免],再用约100mL85%乙醇洗去可溶性糖类[注意：此步骤目的是去除可溶性糖]。将残留物移入250mL烧杯内,并用50mL水洗滤纸及漏斗,洗液并入烧杯内,将烧杯置沸水浴上加热15min,使淀粉糊化,放冷至60℃以下,加20mL淀粉酶溶液,在55～60℃保温1h,并时时搅拌[注意：温度过高,淀粉酶的活性破坏]。然后取1滴此液加1滴碘溶液,应不现蓝色,若显蓝色,再加热糊化并加20mL淀粉酶溶液,继续保温,直至加碘不显蓝色为止。加热至沸,冷后移入250mL容量瓶中,并加水至刻度,混匀,过滤[注意：此时淀粉已水解成双糖,过滤可去除残渣和纤维素]。弃去初滤液,取50mL滤液,置于250mL锥形瓶中,加5mL6mol/L盐酸,装上回流冷凝器,在沸水浴中回流1h,冷后加2滴甲基红指示剂,用5mol/L氢氧化钠溶液中和至中性,溶液转入100mL容量瓶中,洗涤锥形瓶,洗液并入100mL容量瓶中,加水至刻度,混匀备用[注意：淀粉在沸水浴条件下糊化是淀粉水解的第一步反应,然后在淀粉酶的作用下,分解成短链淀粉、糊精、麦芽糖等低聚合的糖,所以在淀粉酶解后需用酸进一步水解得到葡萄糖]。

(2) 测定：按《还原糖的测定方法》操作。同时量取50mL水及与样品处理时相同量的淀粉酶溶液,按同一方法做试剂空白试验。

6. 计算

$$w_1 = \frac{(m_1 - m_2) \times 0.9}{m_3 \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{V_3}{100} \times 1000} \times 100$$

式中 w_1——样品中淀粉的含量,%；

m_1——测定用样品中还原糖的含量,mg;

m_2——试剂空白中还原糖的含量,mg;

0.9——还原糖(以葡萄糖计)换算成淀粉的换算系数;

m_3——称取样品质量,g;

V_1——水解用样品溶液体积,mL;



V_2 ——样品定容总体积，mL；

V_3 ——测定用样品处理液的体积，mL。

(二) 酸水解法

1. 原理

样品经除去脂肪及可溶性糖类后，其中淀粉用酸水解成具有还原性的单糖，然后按还原糖测定，折算成淀粉。

2. 适用范围

本法适用于含淀粉食物。

3. 仪器

(1) 水浴锅。

(2) 高速组织捣碎机：1200r/min。

(3) 皂化装置并附 250mL 锥形瓶。

4. 试剂

除特殊说明外，实验用水为蒸馏水，试剂为分析纯。

(1) 乙醚。

(2) 85%乙醇溶液。

(3) 6mol/L HCl 溶液。

(4) 10mol/L NaOH 溶液。

(5) 2.5mol/L NaOH 溶液。

(6) 甲基红指示剂：其0.2%乙醇溶液。

(7) 精密 pH 试纸。

(8) 20%乙酸铅溶液。

(9) 10% Na_2SO_4 溶液。

(10) 其余试剂同还原糖的测定。

5. 操作方法

(1) 样品处理：

① 粮食、豆类、糕点、饼干等较干燥的样品：称取 2.0～5.0g 磨碎过 40 目筛的样品，置于放有慢速滤纸的漏斗中，用 30mL 乙醚分 3 次洗去样品中脂肪，弃去乙醚。再用 150mL85%乙醇溶液分数次洗涤残渣，除去可溶性糖类物质。并滤干乙醇溶液，以 100mL 水洗涤漏斗中残渣并转移至 250mL 锥形瓶中，加入 30mL6mol/L 盐酸，接好冷凝管，置沸水浴中回流 2h。回流完毕后，立即置流水中冷却。待样品水解冷却后，加入 2 滴甲基红指示剂，先以 40% NaOH 溶液调至黄色，再以 6mol/L 盐酸校正至水解液刚变红色为宜。若水解液颜色较深，可用精密 pH 试纸测试，使样品水解液的 pH 约为 7。然后加 20mL20%乙酸铅溶

液，摇匀，放置10min。再加20mL10%硫酸钠溶液，以除去过量的铅。摇匀后将全部溶液及残渣转入500mL容量瓶中，用水洗涤锥形瓶，洗液合并于容量瓶中，加水稀释至刻度。过滤，弃去初滤液20mL，滤液供测定用。

② 蔬菜、水果、各种粮豆含水熟食制品：按1:1加水在组织捣碎机中捣成匀浆（蔬菜、水果需先洗净、晾干，取可食部分）。称取5～10g匀浆（液体样品可直接量取），于250mL锥形瓶中，加30mL乙醚振摇提取（除去样品中脂肪），用滤纸过滤去除乙醚，再用30mL乙醚淋洗2次，弃去乙醚。以下按①自"再用150mL85%乙醇溶液"起依法操作。

（2）测定：按还原糖的测定步骤操作。

6. 计算

$$w_2 = \frac{(m_1 - m_2) \times 0.9}{m \times \frac{50}{250} \times \frac{V}{100} \times 1000} \times 100$$

式中 w_2——样品中淀粉的含量，g/100g；

m_1——测定用样品中还原糖的含量。mg；

m_2——试剂空白中还原糖的含量，mg；

m——称取样品质量，g；

V——测定用样品处理液的体积，mL。

0.9——还原糖（以葡萄糖计）换算成淀粉的换算系数。

[注意：酸水解能分解部分半纤维素，形成具有还原力的单糖，如木糖、阿拉伯糖等，可影响分析结果。为了比较正确地测定食物中淀粉含量，建议采用淀粉酶糖化淀粉，除去不可溶性的残渣后，再用酸水解使之成为葡萄糖，然后测定其含量，最后换算成淀粉]

（三）可消化淀粉和抗性淀粉的测定方法

抗性淀粉（resistant starch，RS）是1982年由Englyst首先发现并提出的，1990年FAO将抗性淀粉定义为"健康者小肠内不吸收的淀粉及其降解产物"。现在对抗性淀粉的分类主要有4类：RS1为生理上不接受的淀粉，一般为存在于细胞壁内较大的淀粉颗粒，一旦淀粉颗粒被破坏，抗性淀粉即转变为可消化淀粉。通常研磨、粉碎即可破坏淀粉颗粒。RS2为有一定粒度的淀粉，在结构上存在特殊的晶体构象，对淀粉酶具有高度抗性，通常存在于生的薯类、香蕉中，与淀粉颗粒大小无关。RS3为回生淀粉（retrograded），在加工过程中因淀粉结构等发生变化由可消化淀粉转化而成。如煮熟的米饭在4℃以下放置过夜后可产生RS3。RS4为通过基因改造或物理化学方法引起分子结构变化而衍生的抗性淀粉。

目前抗性淀粉的测定主要是酶法，虽然抗性淀粉不被α－淀粉酶水解，但在沸水浴中经凝胶化可以转变成可消化淀粉。利用这些性质，样品可先在37℃进



行酶解，然后用 80% 乙醇提取已消化的淀粉，余下的抗性淀粉经凝胶化后用直接法测定。另外也可先将淀粉凝胶化，测定总的淀粉含量，然后再测定可消化淀粉含量，用差减法间接测定抗性淀粉。这里主要介绍直接法。

1. 原理

样品先在 37℃ 下经 α－淀粉酶水解，使可消化淀粉转化成葡萄糖，用 80% 乙醇提取可消化淀粉。未水解的抗性淀粉部分经沸水浴凝胶化后，在淀粉葡萄糖苷酶作用下转化成葡萄糖。用葡萄糖氧化酶法分别测定葡萄糖含量，再换算成可消化淀粉和抗性淀粉含量。

2. 适用范围

参考 Englyst 和 Champ 的方法。适用于所有含淀粉食物的测定。

3. 仪器

（1）恒温水浴箱。

（2）恒温箱。

（3）分光光度计。

4. 试剂

除特殊说明外，实验用水为蒸馏水，试剂为分析纯。

（1）0.1mol/L 乙酸缓冲液（pH 5.0）：称取 14.28g 乙酸钠（$CH_3COONa \cdot 3H_2O$）溶于水中，加入 2.7mL 冰乙酸，并调节 pH5.0，用水定容至 1L。

（2）酶溶液：分别称取 4gα－淀粉酶（α－amylase，Sigma 公司）、1g 淀粉葡萄糖苷酶（amyloglucosidase，Sigma 公司）和 0.3g 转换酶（invertase，Sigma 公司）于研钵中，用 0.1mol/L 乙酸缓冲液研磨制成匀浆，并调节体积为 100mL。3000r/min 离心 5min，取上清液。

（3）淀粉葡萄糖苷酶溶液：称取 2g 淀粉葡萄糖苷酶，加 100mL 0.1mol/L 乙酸缓冲液研磨成匀浆。3000r/min 离心 5min，取上清液。

（4）80%乙醇：800mL 乙醇加水至 1L。

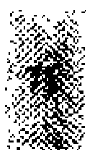
（5）4mol/L 氢氧化钾溶液：称取 224g 氢氧化钾，用水溶解并加至 1L。

（6）2mol/L 乙酸溶液：量取冰乙酸 118mL，加水至 1L，混匀。

（7）其他试剂同“葡萄糖测定方法”。

5. 操作步骤

（1）样品处理：测定 RS1 时，直接称取样品 0.2～1g；测定 RS2 时，选用生的样品，先研磨打碎后再称取样品 0.2～1g；测定 RS3 时，则先将样品加水煮沸至少 15min，使之凝胶化，然后取出放入 4℃ 冰箱冷藏过夜，再混匀后称取样品 0.2～1g（需折合水分）。加入 10mL 酶溶液，轻轻混匀。37℃ 温箱或水浴中酶解 16h。加入 40mL 无水乙醇，使乙醇含量终浓度为 80%，充分摇匀。静置



30min,3000r/min 离心 15min,上清液转移至 100mL 容量瓶中。用 80%乙醇反复洗涤沉淀 2～3 次。合并上清液并用乙酸缓冲液定容,备用。

(2) 抗性淀粉水解：经反复洗涤的沉淀于 100℃ 干燥,然后用 15mL 水将沉淀转移至锥形瓶中,沸水浴中加热 30min。冷却至室温。加入 1 倍的 4mol/L 氢氧化钾溶液,使氢氧化钾终浓度为 2mol/L,室温下混合 30min(注意：在样品凝胶化后,2mol/L 氢氧化钾的作用是进一步破坏淀粉结构,如果氢氧化钾的浓度过高或过低,不利于结构破坏,操作中需注意)。加入约 30mL 2mol/L 乙酸溶液,调节 pH 为 5.0,再加入淀粉葡萄糖苷酶溶液 5mL,65～70℃ 水浴 90min。转移至 100mL 容量瓶中用乙酸缓冲液定容至刻度。

(3) 测定：吸取 0.5mL 上清液和抗性淀粉水解液,按照葡萄糖氧化酶法分别测定葡萄糖含量。

6. 计算

根据稀释定容体积和称样量计算葡萄糖结果,再乘以 0.90,分别折算成可消化淀粉和抗性淀粉含量。同时做葡萄糖标准曲线。

7. 注意事项

(1) Englyst 根据抗性淀粉的分类,对样品处理采用不同的处理方法。读者可根据实验需要选择相应的方法。

(2) Englyst 测定抗性淀粉时,模拟胃肠道内环境,根据 α－淀粉酶水解时间长短,将 20min 时已水解的淀粉称为快消化淀粉,20～120min 水解的淀粉称为慢消化淀粉,120min 后仍没有水解的淀粉称为抗性淀粉。有的学者指出在体内实验中,肠道对淀粉的消化能力可能超过 6h,认为 120min 的水解时间过于短暂,并建议水解时间应延长至 16h。目前国际上检测方法尚没有完全统一,多采用的是 Englyst 和 Champ 的方法,这里的方法是对二者的综合并略加改进。

(3) 如果将样品先用 80%乙醇去除可溶性糖后,再加水煮沸,使之凝胶化,然后用氢氧化钾破坏淀粉结构,进而采用淀粉葡萄糖苷酶水解,所测定的结果即为总葡萄糖 (total glucose)含量。结果乘以 0.9 即为总淀粉含量。

六、粗多糖的测定方法

1. 原理

分子质量大于 10 000u 的多糖经 80%乙醇沉淀后，加入碱性铜试剂,选择性地从其他高分子物质中沉淀出葡聚糖,沉淀部分与苯酚－H_2SO_4 反应,生成有色物质,在 485nm 条件下,有色物质的吸光度值与葡聚糖浓度成正比。

2. 适用范围

本法参照 AOAC 方法——甘蔗糖中葡聚糖的测定方法(1988.12)。适用于检测含有分子质量大于 10 000u 葡聚糖的样品。本方法由北京卫生防疫站建

立,经中国预防医学科学院营养与卫生研究所验证。

3. 仪器

(1) 分光光度计。

(2) 离心机。

(3) 旋转混匀器。

(4) 恒温水浴锅。

4. 试剂

除特殊说明外,实验用水为蒸馏水,试剂为分析纯。

(1) 80%乙醇：800mL 无水乙醇加水 200mL。

(2) 2.5mol/L NaOH 溶液：100gNaOH 加蒸馏水稀释至 1L,加入固体无水硫酸钠至饱和。

(3) 铜贮存液：称取 3.0g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,30.0g 柠檬酸钠加水溶解至 1L。溶液可贮存 2 周。

(4) 铜应用溶液：取铜贮存液 50mL,加水 50mL 混匀后加入无水硫酸钠 12.5g,临用新配。

(5) 洗涤液：取水 50mL,加入 10mL 铜应用溶液,10mL 2.5mol/L NaOH 溶液,混匀。

(6) 1.8mol/L H_2SO_4：取 100mL 浓硫酸用水稀释至 1L。

(7) 20g/L 苯酚溶液：称取 2.0g 苯酚,加水溶解并稀释至 100mL,混匀备用。

(8) 葡聚糖标准液：称取 500mg 葡聚糖(分子质量 500 000u)于称量皿中,105℃干燥 4h 至恒重,置于装有干燥硅胶的干燥器中冷却。准确称取 100mg 干燥后的葡聚糖,用水定容至 100mL,葡聚糖标准浓度为 1.0mg/mL。

(9) 葡聚糖标准应用液：吸取葡聚糖标准液 10mL,用水稀释 10 倍,葡聚糖终浓度为 0.1mg/mL。

5. 操作方法

(1) 样品处理：

① 样品提取：称取样品 1～5g,加水 100mL,沸水浴加热 2h,冷却至室温,定容至 200mL(V_1),混匀后过滤,弃初滤液,收集余下滤液。

② 沉淀高分子物质：准确吸取上述滤液 100mL(V_2),置于烧杯中,加热浓缩至 10mL,冷却后,加入无水乙醇 40mL,将溶液转至离心管中以 3000r/min 离心 5min,弃上清液,残渣用 80%乙醇洗涤 3 次,残渣供沉淀葡聚糖之用。

③ 沉淀葡聚糖：上述残渣用水溶解,并定容至 50mL(V_3),混匀后过滤,弃初始滤液后,取滤液 2.0mL(V_4),加入 2.5mol/L NaOH 2.0mL,铜应用溶液

2.0mL，沸水浴中煮沸 2mim，冷却后以 3000r/min 离心 5min，弃上清液，残渣用洗涤液洗涤 3 次，残渣供测定葡聚糖之用。

④ 测定葡聚糖：上述残渣用 2.0mL1.8mol/L H_2SO_4 溶解，用水定容至 100mL(V_5)。准确吸取 2.0mL(V_6)，置于 25mL 比色管中，加入 1.0mL 苯酚溶液，10mL 浓硫酸，沸水浴煮沸 2min，冷却比色。从标准曲线上查得相应含量，计算粗多糖含量。

(2) 标准曲线制备：精密吸取葡聚糖标准应用液 0.10、0.20、0.40，0.60、0.80、1.00、1.50、2.00mL(分别相当于葡聚糖 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.15、0.20mg)，补充水至 2.0mL，加入苯酚溶液 1.0mL，浓硫酸 10mL，混匀，沸水浴 2min，混匀，沸水浴 2min，冷却后用分光光度计在 485nm 波长处以试剂空白溶液为参比，测定吸光度值(A)，以葡聚糖浓度为横坐标，A 为纵坐标绘制标准曲线。

6. 计算

从标准曲线上查得样品相应含量，计算粗多糖含量。

$$葡聚糖(\%) = \frac{m_1 \times V_5 \times V_3 \times V_1 \times 0.1}{V_6 \times V_4 \times V_2 \times m} = \frac{m_1 \times 250}{m}$$

式中 m_1 ——从标准曲线上查得样品测定管中葡聚糖含量，mg；
V_1 ——样品提取时定容体积，mL；
V_2 ——沉淀高分子物质取液量，mL；
V_3 ——沉淀葡聚糖时定容量，mL；
V_4 ——沉淀葡聚糖时取液量，mL；
V_5 ——测定葡聚糖时定容体积，mL；
V_6 ——样品比色管中取样液体积，mL；
m ——样品称量质量，g；
0.1 ——将 mg/g 换算成 g/100g 的系数。

7. 注意事项

(1) 苯酚 - H_2SO_4 溶液可以和多种糖类进行显色反应，常用于总糖的测定。所以测定过程中应注意容器及试剂中其他糖类的干扰。

(2) 苯酚 - H_2SO_4 溶液和不同类的糖反应，显色的强度略有不同，反映在标准曲线的斜率不同。如果已知样品中糖的结构，应尽量以同类糖的纯品做标准品，或以含有已知浓度的同类产品做对照品进行检测分析；如果样品中糖的类型未知或结构多样，则只能以转化糖计报告结果。

(3) 试验证明葡萄糖、果糖等单糖，蔗糖、乳糖等双糖、棉子糖等低聚糖，淀粉、糊精等多糖及甜味剂糖精不干扰粗多糖测定。



七、膳食纤维的测定方法

“粗纤维”一词最早用于营养学研究，并被认为是对人体不起营养作用的一种非营养成分。然而近年来分析技术的发展和对这种“非营养素”认识的提高，“粗纤维”也被“膳食纤维”所替代，而且赋予更丰富的内容。膳食纤维大致分为二类，一类为可溶性的，一类为不可溶性的，二者合并即为总的膳食纤维。它主要包括植物细胞壁的成分如纤维素、半纤维素、果胶、木质素、角质和二氧化硅等成分，最早曾有中型洗涤剂法和酸性洗涤剂法等，测定结果常不能包括全部。本章所介绍的是 Englist 建立的、AOAC 推荐的方法。它主要测定为可溶性的膳食纤维、不可溶性膳食纤维和总膳食纤维三种。

膳食纤维实际上属于碳水化合物的范畴。

膳食纤维的物化特性主要包括 5 个方面：

（1）很高的持水力。

（2）对阳离子有结合和交换能力。

（3）对有机化合物有吸附螯合作用。

（4）具有类似填充剂的充盈作用。

（5）可改变肠道系统中的微生物群系组成。

膳食纤维的测定方法主要有三种，包括非酶－重量法、酶重量法和酶化学法。非酶重量法是一个比较古老的方法，只能用于粗纤维的测定。而中性洗涤剂法也只能测定不溶性的膳食纤维。酶重量法却可以测定总膳食纤维（包括可溶和不可溶性膳食纤维），也是 AOAC 的标准方法。酶化学法是 AOAC 最新承认的另一个标准方法，但此法易受仪器条件的限制，不适用于普通实验室。目前国标采用的还是中性洗涤剂法，食物成分表中列出的数据都是不溶性膳食纤维，所以下文先介绍不溶性膳食纤维的测定方法。

（一）中性洗涤剂法

1．原理

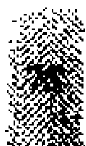
在中性洗涤剂的消化作用下，样品中的糖、淀粉、蛋白质、果胶等物质被溶解除去，不能消化的残渣为不溶性膳食纤维，主要包括纤维素、半纤维素、木质素、角质和二氧化硅等，并包括不溶性灰分。

2．适用范围

GB 12394—90 适用于各类植物性食物和含有植物性食物的混合食物中不溶性膳食纤维的测定。

3．仪器

（1）烘箱：110～130℃。



（2）恒温箱：(37±2)℃。

（3）纤维测定仪。

（4）如没有纤维测定仪，可由下列部件组成：

电热板：带控温装置。

高型无嘴烧杯：600mL。

玻料坩埚：容量 50mL，孔径 40～60μm。

回流冷凝装置。

抽滤装置：由抽滤瓶、抽滤垫及水泵组成。

4. 试剂

实验用水均为蒸馏水，试剂不加说明均为分析纯试剂。

（1）无水亚硫酸钠。

（2）石油醚：沸程 30～60℃。

（3）丙酮。

（4）甲苯。

（5）中性洗涤剂溶液：将 18.61gEDTA 二钠盐和 6.81g 十水合四硼酸钠置于烧杯中，加水约 150mL，加热使之溶解，将 30g 月桂基硫酸钠和 10mL 乙二醇独乙醚溶于约 700mL 热水中，合并上述两液，再将 4.56g 无水磷酸氢二钠溶于 150mL 热水中，再并入上述溶液中，用磷酸调节上述混合液至 pH6.9～7.1，最后加水至 1000mL。

（6）磷酸盐缓冲液：由 38.7mL 0.1mol/L 磷酸氢二钠和 61.3mL 0.1mol/L 磷酸二氢钠混合而成，pH 为 7。

（7）2.5%α－淀粉酶溶液：称取 2.5gα－淀粉酶(Sigma 公司，Ⅵ－A 型，产品号 6880)溶于 100mLpH7 的磷酸盐缓冲溶液中，离心，过滤，滤过的酶液备用。

（8）耐热玻璃棉：耐热 130℃，美国 Corning 玻璃厂出品，PYREX 牌。

5. 操作步骤

（1）样品制备：

① 粮食：磨粉，过 20 目筛(1mm)，贮于塑料瓶内，盖紧瓶塞保存，备用。

② 蔬菜及其他植物性食物：取其可食部，用水洗净，纱布吸去水分，打碎，混合均匀后备用。

③ 脂肪含量超过 10%样品：需先去除脂肪，即样品 1.00g，用石油醚提取 3 次，每次 10mL。

（2）取样 0.5～1.0g，加 100mL 中性洗涤剂溶液，再加 0.5g 无水硫酸钠。

（3）电炉加热，5min 内使其煮沸，移至电热板上，保持微沸 1h。

（4）于玻料坩埚中铺 1g 玻璃棉，移至烘箱中，110℃4h，取出置干燥器中，晾

至室温，万分之一天平称重，得 m_1。

（5）将煮沸后样品趁热倒入滤器，用水泵抽滤。用 600mL 热水（90～100℃），分数次洗烧杯及滤器，抽干。洗净滤器下部的液体和泡沫，塞上橡皮塞。

（6）于滤器中加酶液，液面需覆盖纤维，用细针挤压掉其中气泡，加几滴甲苯，盖上表玻皿，37℃ 恒温箱中过夜。

（7）取出滤器，除去底部塞子，抽去酶液，并用 300mL 热水分数次洗去残留酶液，用碘液检查，如有残留，继续加酶水解，如淀粉已除尽，抽干，再以丙酮洗 2 次。

（8）将滤器置烘箱中，110℃ 4h，取出，置干燥器中，晾至室温，精确称重，得 m_2。

6. 计算

$$w = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100\%$$

式中　w——样品中不溶性膳食纤维的含量，%；

m_1——滤器加玻璃棉的质量，g；

m_2——滤器加玻璃棉及样品中纤维的质量，g；

m——样品质量，g。

7. 注意事项

（1）因酶配成溶液后其活力会随时间延长而下降，从而影响酶解效力，所以酶溶液需当天现配。

（2）过滤时若遇到操作困难，可采取滴加淀粉酶和将样品称重减少至 0.3g 的方法来加快过滤。

（3）每次实验用完的坩埚去除玻璃棉，若玻板上残渣较多，可用重铬酸钾洗液浸泡数小时后取出，用水冲洗干净以备下次实验使用。

（二）酶－重量法

1. 原理

样品分别用 α－淀粉酶、蛋白酶、葡萄糖苷酶进行酶解消化以去除蛋白质和可消化的淀粉。总膳食纤维（TDF）是先酶解，然后用乙醇沉淀，再将沉淀物过滤，将 TDF 残渣用乙醇和丙酮冲洗，干燥称重。不溶性和可溶性膳食纤维（IDF 和 SDF）是酶解后将 IDF 过滤，过滤后的残渣用热水冲洗，经干燥后称重。SDF 是将上述滤出液用 4 倍量的 95% 乙醇沉淀，然后再过滤，干燥，称重。TDF、IDF 和 SDF 量通过蛋白质、灰分含量进行校正。

2. 适用范围

本方法适用于各类植物性食物和保健食品（AOAC991.43）。

3. 仪器

(1) 烧杯:400mL 或 600mL 高脚型。

(2) 过滤用坩埚:玻料滤板,美国试验和材料学会(ASTM)40～60μm, Pyrex 60mL(Corning No.36060 buchner,或同等的)。如下处理:

① 在灰化炉 525℃灰化过夜。炉温降至 130℃以下取出坩埚。

② 用真空装置移出硅藻土和灰质。

③ 室温下用 2%清洗溶液浸泡 1h。

④ 用水和去离子水冲洗坩埚;然后用 15mL 丙酮冲洗然后风干。

⑤ 在干燥的坩埚中加 0.5g 硅藻土,在 130℃烘干恒重。

⑥ 在干燥器中冷却 1h,记录坩埚加硅藻土质量,精确至 0.1mg。

(3) 真空装置:

① 真空泵或抽气机作为控制装置。

② 1L 的厚壁抽滤瓶。

③ 与抽滤瓶相配套的橡皮圈。

(4) 振荡水浴箱:

① 自动控温使温度能保持在(98±2)℃。

② 恒温控制在 60℃。

(5) 天平:分析级,精确至±0.1mg。

(6) 马福炉:温度控制在(525±5)℃。

(7) 干燥箱:温度控制在 105℃和(130±3)℃。

(8) 干燥器:用二氧化硅或同等的干燥剂。干燥剂两周一次在 130℃烘干过夜。

(9) pH 计:注意温控,用 pH4.0、7.0 和 10.0 缓冲液标化。

(10) 移液管及套头:容量 100μL 和 5mL。

(11) 分配器或量筒:

① (15±0.5)mL,供分配 78%的乙醇、95%的乙醇以及丙酮。

② (40±0.5)mL,供分配缓冲液。

(12) 磁力搅拌器和搅拌棒。

4. 试剂

全过程使用去离子水,试剂不加说明均为分析纯试剂。

(1) 乙醇溶液:

① 85%:加 895mL95%乙醇在 1L 量筒中,用水稀释至刻度。

② 78%:加 821mL95%乙醇在 1L 量筒中,用水稀释至刻度。

(2) 丙酮。



(3) 供分析用酶：在 0～5℃下贮存。

① 热稳定 α－淀粉酶溶液：Cat. No. A3306, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO63178, 或 Termamyl 300L, Cat. No. 361－6282, Novo－Nordisk, Bagsvaerd, Denmark, 或等效的酶。

② 蛋白酶：Cat. No. P3910, Sigma Chemical Co., 或等效的。当天用 MES/TRIS 缓冲液中现配 50mg/mL 酶溶液。

③ 淀粉葡糖苷酶溶液：Cat. No. AMG A9913, Sigma Chemical Co., 或等效的。

(4) 硅藻土：酸洗(Celite 545 AW, No. C8656, Sigma Chemical Co., 或等效的)。

(5) 洗涤液：两者挑一。

① 铬酸：120g 重铬酸钠 $Na_2Cr_2O_7 \cdot 2H_2O$, 1000mL 蒸馏水和 1600mL 浓硫酸。

② 实验室用液体清洁剂, 预备急需清洗的(Micro, International Products Corp., Trenton, NJ08016, 或等效的)。用水配制 2%溶液。

(6) MES－TRIS 缓冲液：0.05mol/L, 温度在 24℃时 pH 为 8.2。

① MES：2－(N－吗啉代)磺酸基乙烷(No. M－8250, Sigma Chemical Co. 或等效的)。

② TRIS：三羟(羟甲基)氨基甲烷(No. T－1503, Sigma Chemical Co. 或等效的)。

在 1.7L 的蒸馏水中溶解 19.52gMES 和 12.2gTRIS, 用 6mol/L NaOH 调 pH 到 8.2, 用水定容至 2L[注意：24℃时的 pH 为 8.2, 但是, 如果缓冲液温度在 20℃, pH 就为 8.3, 如果温度在 28℃, pH 为 8.1。为了使温度在 20～28℃之间, 需根据温度调整 pH]。

(7) HCl 溶液：0.561mol/L, 加 93.5mL 6mol/L 盐酸到 700mL 水中, 用水定容至 1L。

5. 操作方法

(1) 样品制备：

① 固体样品：如果样品粒度＞0.5mm, 研磨后过 0.3～0.5mm(40～60 目)筛。

② 高脂肪样品：如果脂肪含量＞10%, 用石油醚去脂。每克样品用 25mL, 每次提取完静置一会儿再小心将烧杯倾斜, 慢慢将石油醚倒出, 共洗 3 次。

③ 高碳水化合物样品：如果样品干重含糖＞50%, 用 85%乙醇去除糖分, 每克样品每次 10mL, 共洗 3 次轻轻倒出, 然后在 40℃烘箱中不时翻搅干燥过夜, 并研磨过 0.5mm 筛。

（2）样品消化：

① 准确称取双份(1.000±0.005)g 样品(m_1 和 m_2)，置于高脚烧杯中。

② 在每个烧杯中加入 40mL MES－TRIS 缓冲液，在磁力搅拌器上搅拌直到样品完全分散[注意：防止团块形成，使受试物与酶能充分接触]。

③ 用热稳定的淀粉酶进行酶解处理：加 100μL 热稳定的淀粉酶溶液，低速搅拌。用铝箔片将烧杯盖住，在 95～100℃ 水浴中反应 30min[注意：起始的水浴温度应达到 95℃]。

④ 冷却：所有烧杯从水浴中移出，晾至 60℃。打开铝箔盖，用刮勺将烧杯边缘的网状物以及烧杯底部的胶状物刮离，以使样品能够完全的酶解。用 10mL 蒸馏水冲洗烧杯壁和刮勺。

⑤ 用蛋白酶进行酶解处理：在每个烧杯中各加入 100μL 蛋白酶溶液。用铝箔盖住，在 60℃ 持续摇动反应 30min[注意：开始时的水浴温度应达 60℃]，使之充分反应。

⑥ pH 测定：30min 后，打开铝箔盖，搅拌中加入 5mL 0.561mol/L HCl 至烧杯中。60℃ 时用溶液或 1mol/L HCl 溶液调最终 pH 为 4.0～4.7[注意：当溶液为 60℃ 时检测和调整 pH，因为在较低温度时 pH 会偏高]。

⑦ 用淀粉葡糖苷酶溶液酶解处理：搅拌同时加 100μL 淀粉葡糖苷酶溶液，用铝箔盖住，在 60℃ 持续振摇反应 30min，温度应恒定在 60℃。

（3）测定：

① 总的膳食纤维测定：用乙醇沉淀膳食纤维：在每份样品中，加入预热至 60℃ 的 95% 乙醇 225mL，乙醇与样品的体积比为 4∶1。室温下沉淀 1h。

过滤装置：用 15mL78% 乙醇将硅藻土湿润和重新分布在已称重的坩埚中。

用适度的抽力把坩埚中的硅藻土吸到玻板上。

酶解过滤，用 78% 乙醇和刮勺转移所有内容物微粒到坩埚中[注意：如果一些样品形成胶质，用刮勺破坏表面，以加速过滤]。

抽真空，分别用 15mL 的 78% 乙醇，95% 乙醇和丙酮冲洗残渣各 2 次，将坩埚内的残渣抽干后在 105℃ 烘干过夜。将坩埚置干燥器中冷却至室温。坩埚重量，包括膳食纤维残渣和硅藻土，精确称至 0.1mg。减去坩埚和硅藻土的干重，计算残渣重。

② 蛋白质和灰分的测定：取成对的样品中的一份测定蛋白质，用本书前述或 GB－960.52 方法测定。用(N×6.25 作为蛋白质的转换系数)。

分析灰分时用平行样的第二份在 525℃ 灼烧 5h，在干燥器中冷却，精确称至 0.1mg，减去坩埚和硅藻土的质量，即为灰分质量。

③ 不溶性膳食纤维测定：称适量样品按②进行酶解，过滤前用 3mL 水湿

润和重新分布硅藻土在预先处理好的坩埚上，保持抽气使坩埚中的硅藻土抽成均匀的一层。

过滤并冲洗烧杯，用10mL70℃水洗残渣2次，然后再过滤并用水洗，转移到600mL高脚烧杯，保留用以测定可溶性膳食纤维，按④操作。

用抽滤装置，分别用15mL78%乙醇，95%乙醇和丙酮各冲洗残渣2次。

[注意：应及时用78%乙醇、95%乙醇和丙酮冲洗残渣否则可造成不溶性膳食纤维数值的增大]

按②用双份样品测定蛋白质和灰分。

④ 可溶性膳食纤维测定：将不溶性膳食纤维过滤后的滤液收集到600mL高脚烧杯中，对比烧杯和滤过液，估计体积。

加约滤出液4倍量已预热至60℃的95%乙醇。或者将滤液和洗过残渣的蒸馏水的混合液调至80g，再加入预热至60℃的95%乙醇320mL。

室温下沉淀1h。下面按②测定总膳食纤维，从"湿润和重新分布硅藻土……"。

6. 计算

TDF、IDF、SDF均用同一公式计算。

膳食纤维(DF，g/100g)测定：

$$DF = \frac{\frac{(m_5 + m_6)}{2} - m_3 - m_4}{\frac{(m_1 + m_2)}{2}} \times 100$$

式中　m_5、m_6——双份样品残留物质量，mg；

m_3、m_4——分别为蛋白质和灰分质量，mg；

m_1、m_2——样品质量，mg。

第三节　食物中脂肪的测定方法

一、食物脂肪的测定方法

(一) 索泰(HT)抽提法

索氏抽提法提取一个样品的时间取决于样品的种类，一般需要6～12h，需较大的人力、物力和时间。而索泰抽提法可用不同沸点的多种溶剂，提取一个样品只需30～60min，此法快速、简便、准确、节约溶剂，并且安全省力。

1. 原理

原理与索氏提取法相同，即在已烘至恒重的一定量的干样品中加入有机溶

剂，在一定的温度下加热，使样品中的脂肪溶于有机溶剂中，然后将溶剂蒸干，称残留物的重量，即为干样品中的粗脂肪（包括磷脂、固醇、游离脂肪酸等脂溶性物质）含量。

2. 适用范围

此方法适用于测定食物、饲料、土壤、橡胶、药物以及其他物质中的脂肪。

3. 仪器

常用实验仪器

(1) 瑞士 Tecator 公司设计生产的索泰(HT)(SoxtecHT)系统。

(2) 分析天平，感量 0.0001g。

(3) 恒温干燥箱。

4. 试剂

根据不同的样品，选择不同的有机溶剂（分析纯）。例如：测定食物样品用无水乙醚。其他的有机溶剂是：氯仿、石油醚等。

5. 操作步骤

(1) 提取：将已称重的干燥样品放入滤纸套中，一并置入提取套管内。在已称重的提取杯中加入占体积约 1/3（约为 25～50mL）的有机溶剂，将杯与提取套管密切相连，使不漏气，然后将调节钮放在垂直位置，将控制钮放到沸腾位。根据溶剂种类不同，调节加热温度，使溶剂沸腾。反复蒸馏提取，一般需 30～60min。若用无水乙醚为提取溶剂，加热到 80℃，蒸馏 20～30min 即可。

(2) 淋洗：蒸馏提取完毕，将控制钮移至淋洗位上，使已冷却的溶剂淋洗出样品中最后残留的微量脂溶物，约淋洗 30～40min。

(3) 回收溶剂：将调节钮放到水平位置，溶剂蒸发杆扳到蒸发位置上，提取杯中的残留溶剂即全部蒸发。

(4) 称重：取下提取杯，在 100℃ 烘箱内烘 0.5h，放入干燥器内冷却至室温，称重。

6. 计算

$$w = \frac{(m_3 - m_2)}{m_1}$$

式中 w ——脂肪干样含量，g/100g；

m_1 ——样品质量，g；

m_2 ——提取杯质量，g；

m_3 ——提取杯＋样品脂肪重，g。

7. 注意事项



(1) 同一实验室同时或连续两次测定结果之差不得超过平均值的10%。

(2) 仪器应放在通风柜内。

(二) 罗高氏法

1. 原理

乙醚不能从牛乳及其他液体食品中直接抽提脂肪。需先用碱处理,使酪蛋白钙盐溶解,并降低其吸附力,才能使脂肪球与乙醚混合。加入乙醇,可使乙醇溶解物溶于其中,加入石油醚可使乙醚不与水相混溶,而使分层清晰。将醚层与水相分离,将醚层蒸发后,即得脂肪含量。

2. 适用范围

此方法是测定乳类样品中脂肪含量的基准方法。适用于测定乳类及乳制品类,如鲜奶、奶粉、酸奶、冰淇淋、奶油等食物中脂肪含量。

3. 仪器

(1) 常用实验室仪器。

(2) 分液漏斗。

(3) 恒温烘箱。

(4) 脂肪杯。

4. 试剂

所有试剂,如未注明规格,均指分析纯;所有实验用水,均指蒸馏水。

(1) 氢氧化铵(氨水)。

(2) 95%乙醇。

(3) 乙醚。

(4) 石油醚。

(5) 无水硫酸钠。

5. 操作步骤

取20mL鲜乳称重(如取奶粉样品时,需先准确称取一定量的奶粉后,以1:8的比例加蒸馏水调匀),置于150mL分液漏斗内,加2.5mL氨水,混匀。加入20mL 95%乙醇,混匀。在上述乳混合液中加入30mL乙醚,猛烈振摇1min,再加入30mL石油醚,同样振摇1min,静置分层。分层后,将下层残液放入另一容器内,将上层乙醚液通过无水硫酸钠过滤入已恒重的脂肪杯内。再用10mL乙醚和10mL石油醚重复提取残液一次,仍通过无水硫酸钠过滤入原有的醚提取液杯内。最后用少量洁净的无水乙醚淋洗无水硫酸钠。将上述的醚提取液放在索泰氏抽提器从40~80℃缓缓加热,蒸馏出醚液后,取下杯,在100℃烘箱内烘0.5h,放入干燥器内冷却至室温,称重[注意:第二次用醚液重复提取残液时,不要猛烈振摇,以防乳化]。

6. 计算

$$w = \frac{(m_3 - m_2)}{m_1} \times 100$$

式中 w——鲜乳中脂肪含量，g/100g；

m_1——鲜乳质量，g；

m_2——脂肪杯质量，g；

m_3——鲜乳脂肪＋脂肪杯质量，g。

7. 注意事项

同一实验室同时或连续两次测定结果之差不得超过10%。

二、食物中脂肪酸成分的测定方法

此方法测得的是食物中各种脂肪酸占总脂肪酸的百分比。样品处理简单，快速；方法准确，灵敏度高。

1. 原理

气相色谱法是利用色谱柱中装入担体及固定液，用载气把欲分析的混合物带入色谱柱，在一定的温度与压力条件下，各气体组分在载气和固定液薄膜的气液两相相中的分配系数不同，随着载气的向前流动，样品各组分在气，液两相中反复进行分配，使脂肪酸各组分的移动速度有快有慢，从而可将各组分分离开。然后进行分别测定。

2. 适用范围

此法适用于食物中脂肪酸的分析。

3. 仪器

气相色谱仪。

氢火焰离子化检测器。

氮气、氢气、压缩空气钢瓶。

微处理机。

色谱柱2m×4mm或3m×4mm填充80～100目ChromosorbW，涂以8%或10%（质量分数）二乙二醇琥珀酸酯（DEGS）。

气相色谱条件：

柱温：210℃。

进样器温度：280℃。

检测器温度：280℃。

氮气流速：40mL/cm²。

4. 试剂



所有试剂，如未注明规格，均指优级纯，所有实验用水，均为蒸馏水。

石油醚（沸程 30～60℃）分析纯。

苯。

无水甲醇。

0.4mol/L 氢氧化钾－甲醇溶液：称 2.24g 氢氧化钾溶于少许甲醇中，然后用甲醇稀释到 10mL。

脂肪酸标准（SIGMA）液。

脂肪酸混合标准

CHAIN	%BYWT
6:0	1.0
8:0	5.0
10:0	4.0
12:0	27.0
14:0	10.0
16:0	10.0
18:0	2.0
18:1	15.0
18:2	25.0
18:3	1.0

5. 无水已醇　操作步骤

称取 30～100mg（约 2～6 滴）油脂，置入 10mL 量瓶内，加入 1～2mL 30～60℃沸程石油醚和苯的混合溶剂（1:1），轻轻摇动使油脂溶解。加入 1～2mL 0.4mol/L 氢氧化钾　甲醇溶液，混匀。在室温静置 5～10min 后，加蒸馏水使全部石油醚苯甲酯溶液升至瓶颈上部，放置待澄清。如上清液浑浊而又急待分析时，可滴入数滴无水乙醇，1～2min 内即可澄清。吸取上清液，在室温下吹入氮使其浓缩，所得到浓缩液即可用于气层分析。

6. 计算

在有微处理机的情况下，用归一化计算法则可自动打印出峰面积和各种脂肪酸占总脂肪酸的百分比。归一化计算法不能直接计算脂肪酸的总质量及各种脂肪酸的实际含量。

7. 注意事项

同一样品的两次测定值之差不得超过 2 次测定平均值的 5%。

三、食物中胆固醇的测定方法

食物中胆固醇的测定方法主要有气相色谱法和比色法。色谱法必须具备气

相色谱仪，此仪器价格昂贵，故在国内不易普及，因此选用经济、简便、实用的比色法进行食物中胆固醇的测定。

1．原理

固醇类化合物与酸试剂作用，可脱水，发生聚合反应并产生强的颜色反应。

2．适用范围

此方法适用于动物性食物中胆固醇的测定。

3．仪器

（1）实验室常用设备。

（2）分光光度计。

（3）电热恒温水浴。

4．试剂

所有试剂，如未注明规格，均指分析纯，所有实验用水，均为蒸馏水。

（1）石油醚。

（2）无水乙醇。

（3）浓硫酸。

（4）冰乙酸（优级纯）。

（5）磷酸。

（6）胆固醇标准液（美国 Sigma 公司）。

① 标准贮备液：准确称取胆固醇 100mg（胆固醇标准开启后放在干燥器内）溶于冰乙酸中，并定容至 100mL。其浓度为 1g/L。可保存 2 个月。

② 标准工作液：取标准贮备液 10mL，用冰乙酸定容至 100mL。其浓度为 0.1g/L。此液用时临时配制。

（7）铁矾显色液：

① 贮备液：溶解 4.463g 硫酸铁铵[$FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$]于 100mL 85％磷酸中贮于干燥器内，此溶液在室温中稳定[注意：铁矾贮备液须在实验前 2 周配制，因硫酸铁铵不易溶解，每天要进行短时间的振摇待溶质完全溶于磷酸后再定容到体积]。

② 工作液：吸取贮备液 10mL 用浓硫酸稀释到 100mL。贮于干燥器内。

（8）氢氧化钾 50％溶液：溶解 50g 氢氧化钾于水中，定容至 100mL。

（9）氯化钠 5％溶液：溶解 5g 氯化钠于水中，定容至 100mL。

（10）纯氮（99.99％）。

5．操作步骤

（1）样品脂肪的提取与测定：根据食物种类分别用索氏提取法、研磨法和罗高氏法提取脂肪，并计算出每 100g 食物中脂肪含量。



（2）样品胆固醇的测定：准确称取提取的油脂3～4滴(约含胆固醇300～500μg)置于25mL试管内，加入4mL无水乙醇，0.5mL50%氢氧化钾，在65℃恒温水浴中皂化1h，皂化完毕，取出试管，冷却。加入3mL 5%氯化钠、10mL石油醚，盖紧玻璃塞，振摇2min，静置分层(一般需1h以上)。

［注意：①取样量可按样品中胆固醇的浓度增减。

②皂化时每隔20～30min振摇一次使皂化完全］

取上层石油醚2mL，置于10mL具玻璃塞的试管内，在65℃恒温水浴中用氮气吹干，加入4mL冰乙酸，2mL铁矾显色液，混匀，放置15min后560～575nm下比色。

（3）标准曲线：准确吸取胆固醇工作液0.0、0.5、1.0、1.5、2.0mL分别置于10mL试管内，在各管内加入冰乙酸，使总体积达4mL。沿管壁加2mL铁矾显色液，混匀，在15～90min内，560～575nm下比色。

6．计算

$$x = m_1 \times \frac{V}{V_1} \times \frac{1}{m_2} \times \frac{F}{1000}$$

式中　x——样品中胆固醇含量，mg/100g；

m_1——测得的光密度值在胆固醇标准曲线上显示的胆固醇量，μg；

V——石油醚总体积，mL；

V_1——取出的石油醚体积，mL；

m_2——称取油脂质量，g；

F——样品的脂肪含量，g/100g；

1/1000——折算成每100g食物中胆固醇的质量，mg。

7．注意事项

同一实验室同时或连续2次测定结果之差不得超过平均值的10%。

第四节　水分测定方法

水在许多食物中都是主要成分，水在食品中存在形式有自由水和结合水两种。水除了作为其他食物成分的反应介质外，在水解反应中是直接的反应物。所以水能延长许多食品的保质期，通过与糖、蛋白质和脂类的物理作用，对食品的质量起着重要作用。但同时也是食品易腐败的原因。本章介绍水分测定最通常的方法，实际上，根据水含量的多少和物质的特性，目前水分的测定方法有多种。

1．原理

水的化学符号为H_2O，在食物中水的存在形式为三类，即游离水，吸附于蛋

白质、淀粉及细胞膜上的水,其余是与糖及盐类结合的水。一般样品用烘干法测定水分都采用105℃,主要原因是非游离水分都不能在100℃以下烘干。但是像水果和糖类等含糖多的食物不宜在105℃烘干,因糖在高温时容易分解,尤其是果糖。所以测定含糖高的食品时都采用减压低温烘箱干燥法,用烘干法测定的水分中还包括有少量芳香油,醇及有机酸等物质。

2. 适用范围

本法适用于在95~105℃下,不含或含其他挥发性物质甚微的食品及饲料的测定GB 5009.3—85。

3. 仪器

(1) 电子天平。

(2) 电热恒温干燥箱。

(3) 玻璃干燥器(硅胶干燥剂)。

4. 操作步骤

将样品磨细或切碎。在已称得质量的玻璃皿内称入样品2~10g,将玻璃皿同样品置于温度预先调节至105℃的烘箱内,干燥4h。然后用坩埚钳将玻璃皿放入干燥器内,待降至室温后称重。然后再将玻璃皿置于105℃的烘箱内,干燥2h。干燥后用坩埚钳将玻璃皿放入干燥器内,降至室温后称重。需测至恒重为止。

5. 计算

$$\text{水分}=\frac{\text{烘前玻璃皿及样品质量}-\text{烘后玻璃皿及样品质量}}{\text{样品质量}}\times 100\%$$

6. 注意事项

(1) 烘干法测定水分可用不同温度和不同时间进行干燥。如粮食可在130℃烘1h,其结果与105℃烘4h一致。

(2) 蔬菜样品在购到后必须用水将泥沙洗净再用蒸馏水冲一次,用纱布将菜上的水吸去,再用风扇将附着的水吹去。然后用刀在玻璃板上切碎或用手撕碎,将茎叶混匀后取样。

(3) 因蔬菜含水分多,所以应多取样品测定,如可采20~50g。

(4) 在测定豆瓣酱、蜂蜜、油脂等黏稠样品时,可用1∶1HCl浸后洗净的大粒沙子掺入样品中并用玻棒在烘干的时候,不时的搅拌,才能得到好的结果。

(5) 测定水分的恒重是前后2次称得的质量之差不超过10mg。

第四章　脂溶性维生素

维生素是一类维持人体生命必需的有机化合物，天然存在于食物中。维生素的命名多根据发现的时间顺序以英文字母排序，如维生素 A、维生素 C、维生素 E 等。也有根据特定生理功能如抗干眼病因子、抗坏血酸、生育酚等；或按照其化学结构如视黄醇、硫胺素等。

按照溶解性能可把已知的维生素分为脂溶和水溶两大部分。脂溶性维生素指化学组成含有碳、氢、氧、溶于脂肪或脂溶剂而不溶于水、在食物中与脂类共存在的一类维生素，包括维生素 A（视黄醇、胡萝卜素）、维生素 D、维生素 E（生育酚）、维生素 K（抗凝血因子）。其共同的特点是摄入后存在于脂肪组织中；不能从尿中排出、大剂量摄入时可能引起中毒。

第一节　食物中胡萝卜素的测定方法

胡萝卜素是维生素 A 前体，属于脂溶性维生素，结构上分为 α－，β－和 γ－胡萝卜素三种形式（图 4－1）。胡萝卜素极性较小，对光照敏感，易被氧化破坏。胡萝卜素易溶于醚，不溶于水。

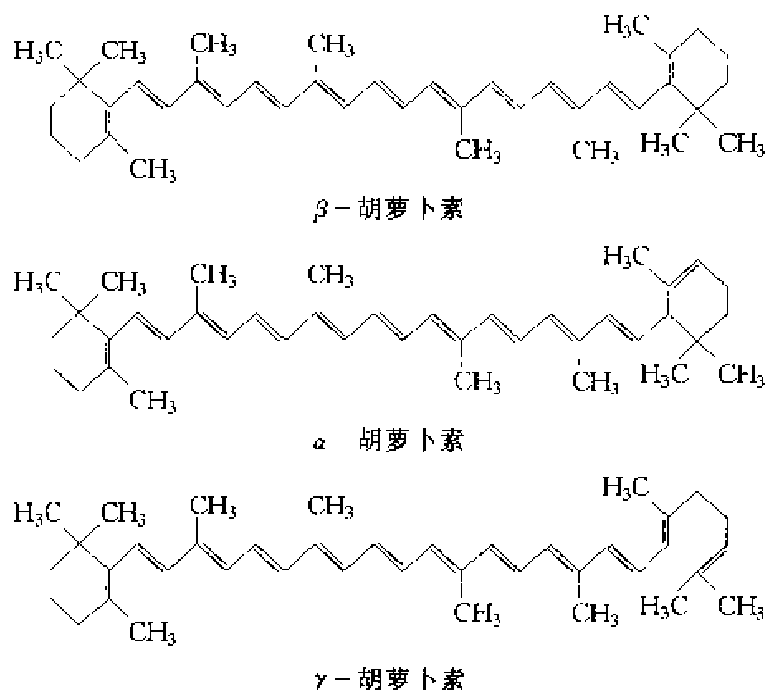


图 4－1　胡萝卜素结构式

天然胡萝卜素主要来源于植物,如胡萝卜、绿叶蔬菜等,其中以β-胡萝卜素含量最高,活性最强。同时植物中还含有其他类胡萝卜素及色素,如叶绿素、叶黄素,这些物质均可被有机溶剂提取,使测定数值偏高,因此测定时应采取适当的分离技术使胡萝卜素同其他干扰物质分离。目前用于食物中胡萝卜素测定的方法主要是色谱法,利用一定的吸附剂对不同色素不同吸附能力,将样品提取液中的胡萝卜素从其他类胡萝卜素中分出来。常用的方法有纸层析、柱层析或高效液相色谱(HPLC)法等。β-胡萝卜素的乙醇溶液在435nm有最大吸收峰,正己烷溶液在450nm有最大吸收峰。目前我国实行的国家标准方法中采用的是纸层析法。

一、纸层析法

1. 原理

以丙酮和石油醚提取食物中的胡萝卜素及其他植物色素,以石油醚为展开剂进行纸层析,胡萝卜素极性最小,移动速度最快,从而与其他色素分离,剪下含胡萝卜素的区带,洗脱后于450nm波长下定量测定。

2. 适用范围

参照GB12389—90。本方法适用于植物性食物和含有植物性食物的混合食物中胡萝卜素的测定,其最小检出限为0.11μg。

3. 仪器和设备

(1) 实验室常用设备。

(2) 玻璃层析缸。

(3) 分光光度计。

(4) 旋转蒸发器:具150mL球形瓶。

(5) 恒温水浴锅。

(6) 皂化回馏装置。

(7) 点样器或微量注射器。

(8) 滤纸。

4. 试剂

除特殊说明外,实验用试剂为分析纯,水为蒸馏水。

(1) 石油醚(沸程30～60℃):同时是展开剂。

(2) 无水 Na_2SO_4:分析纯。

(3) 5% Na_2SO_4 溶液。

(4) 1+1KOH溶液:取50g氢氧化钾溶于50mL水。

(5) 无水乙醇:需脱醛处理。

① 检验乙醇是否含醛：

a. 银氨液：加浓氨水于5%硝酸银液中，直至氧化银沉淀溶解，加入2.5 mol/L氢氧化钠溶液数滴，如发生沉淀，再加浓氨水使之溶解。

b. 银镜反应：加2mL银氨液于试管内，加入几滴乙醇摇匀，加入少许2.5 mol/L氢氧化钠溶液加热。如乙醇中无醛，则没有银沉淀，否则有银镜反应。

② 脱醛方法：取2g硝酸银溶于少量水中，取4g氢氧化钠溶于温乙醇中，将两者倾入1L乙醇中，摇匀，静置1～2d，将上层清液倾入蒸馏瓶中，蒸馏，弃去初蒸的50mL[注意：蒸馏速度控制在1滴/s]。

(6) β-胡萝卜素标准贮备液：取5mg β-胡萝卜素标准品，溶于10mL三氯甲烷中，浓度约为500μg/mL，准确测其浓度。

① 标定：取标准溶液10.0μL，加正已烷3.00mL，混匀。测其吸光度值，比色杯厚度为1cm，以正已烷为空白，入射光波长450nm，平行测定3份，取均值。

② 计算：

$$\rho = \frac{A}{E} \times \frac{1}{1000} \times \frac{3.01}{0.01}$$

式中 ρ——胡萝卜素标准溶液浓度，mg/mL；

A——吸光值；

E——β-胡萝卜素在正已烷溶液中，入射光波长450nm，比色杯厚度1cm，溶液浓度为1mg/kg的吸光系数，为0.2638；

$\frac{1}{1000}$——将mg/kg换算成mg/mL；

$\frac{3.01}{0.01}$——测定过程中稀释倍数的换算。

[注意：配制标准溶液时，应注意标准品的结构是胡萝卜素还是胡萝卜素酯。通常标准品不能完全溶解于有机溶剂中，尤其是胡萝卜素酯，所以必要时应先将标准品进行皂化，再用有机溶剂提取，用蒸馏水洗涤至中性后，浓缩定容。再进行标定。由于胡萝卜素很容易分解破坏，所以每次使用前标准品均需标定，且测定样品时需带标准品同步操作]

(7) β-胡萝卜素标准工作液：将已标定的标准液用石油醚准确稀释，使每毫升溶液相当50μg，避光保存于冰箱中。

5. 操作步骤

(1) 样品的采集和处理：

① 粮食：样品用水洗3次，置60℃烤箱中烤干，磨粉，贮于塑料瓶中，放一小包樟脑精，盖紧瓶塞保存，备用。

② 蔬菜与其他植物性食物：取可食部用水冲洗3次后，用纱布吸去水滴，切碎，用匀浆器制成匀浆，贮于塑料瓶中，冰箱内保存备用。

(2) 测定步骤：以下步骤需在避光条件下进行。

① 样品提取：取适量样品，相当于原样 1～5g(含胡萝卜素约 20～80μg)匀浆，粮食样品视其胡萝卜素含量而定，置 100mL 带塞锥形瓶中，加入丙酮 20mL，石油醚 5mL，振摇 1min，静置 5min，将提取液转入盛有 100mL 5％硫酸钠溶液的分液漏斗中，再于锥形瓶中加入 10mL 丙酮－石油醚混合液，振摇 1min，静置 5min，将提取液并入分液漏斗中。如此提取 2～3 次，直至提取液无色为止。

植物油和高脂肪样品：需先皂化，取适量样品(＜10g)，加脱醛乙醇 30mL，再加 10mL1∶1 氢氧化钾溶液，回流加热 30min，然后用冰水使之迅速冷却，皂化后样品用石油醚提取，直至提取液无色为止。

[注意：原国标方法中，不是所有的样品均进行皂化处理。但是许多植物性样品由于细胞壁较厚，在匀浆或研磨过程中不易完全破坏，使胡萝卜素无法完全释放。并且尽管植物性样品中脂肪含量较少，但仍含有一定脂质成分，如果不进行皂化，会出现提取不完全和提取时出现乳化现象；浓缩时残留脂质，使定容体积不准确；纸层析展开不完全，造成测定结果偏移。所以建议除酒类、饮料外所有样品均进行皂化处理]

② 洗涤：将提取液静置分层，弃去下层水溶液，反复用 5％Na_2SO_4 溶液振摇洗涤，每次约 15mL，直至下层水溶液清亮为止。

将皂化后样品提取液用水洗涤至中性。

将提取液通过盛有 10g 无水 Na_2SO_4 的小漏斗，漏入球形瓶，用少量石油醚分数次洗净分液漏斗和无水硫酸钠层内的色素，洗涤液并入球形瓶内[注意：经过无水硫酸钠辅助过滤，提取液中应不含水分]。

③ 浓缩与定容：将上述球形瓶内的提取液于旋转蒸发器上减压蒸发，水浴温度为 60℃，蒸发至约 1mL 时，取下球形瓶，用氮气吹干，立即加入 2.00mL 石油醚定容，备层析用。

④ 纸层析：

点样：在 18cm×30cm 滤纸下端距底边 4cm 处做一基线，在基线上取 A、B、C、D 4 点，吸取 0.100～0.400mL 浓缩液③在 AB 和 CD 间迅速点样[注意：保持滤纸干燥，点样应该快速细致，在基线上形成细窄直线]。

展开：待纸上所点样液自然挥发干后，将滤纸卷成圆筒状，置于预先用石油醚饱和的层析缸中，进行上行展开[注意：层析缸应事先用石油醚饱和，并且防止水分进入]。

洗脱：待胡萝卜素与其他色素完全分开后，取出滤纸，自然挥发干石油醚，将位于展开剂前沿的胡萝卜素层析带剪下，立即放入盛有 5mL 石油醚的具塞试管中，用力振摇，使胡萝卜素完全溶入试剂中。

⑤ 比色测定：用 1cm 比色杯，以石油醚调零点，于 450nm 波长下，测吸光度值，以其值从标准曲线上查出 β－胡萝卜素的含量，供计算时使用。

⑥ 标准工作曲线绘制：取 β－胡萝卜素标准使用液(浓度为 50μg/mL)1.00、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00mL，分别置于 100mL 具塞锥形瓶中，按样品

测定步骤进行提取、洗涤、纸层析等操作，点样体积为 0.100mL，标准曲线各点胡萝卜素含量依次为 2.50、5.00、7.50、10.00、15.00、20.00μg。为测定低含量样品，可在 0～2.50μg 间加做几点，以胡萝卜素含量为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

6. 计算

$$x = m_1 \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{100}{m} \times \frac{1}{1000}$$

式中　x——样品中胡萝卜素的含量，以 β-胡萝卜素计，mg/100g；

m_1——在标准曲线上所查得的胡萝卜素含量，μg；

V_1——点样体积，mL；

V_2——样品石油醚提取液浓缩后的定容体积，mL；

m——样品质量，g。

7. 注意事项

结果的允许差：同一实验室平行测定或重复测定结果的相对偏差绝对值≤10%。

二、柱色谱法

1. 原理和适用范围

同纸层析法，只是将纸层析换成中性氧化铝柱层析。

2. 试剂

(1) 中性氧化铝：80～100 目。用前 180℃烘干 4h 至恒重。

(2) 其余试剂同纸层析法。

3. 仪器及设备

色谱柱：为 1.0cm×25cm 的玻璃柱，底端收缩变细，并有一活塞，用于调控液体流速；距底端上 1cm 处有一筛板，孔径为 16～30μm。用前需干燥。

其余设备同纸层析法。

4. 操作步骤

(1) 样品采集和处理同纸层析法。

(2) 测定步骤：

① 样品提取、洗涤等步骤同纸层析法。

② 将洗涤后提取液浓缩并定容至 10mL。

③ 柱色谱：将已干燥的中性氧化铝浸泡于石油醚中，以湿法填充色谱柱至高度为 15cm，其上端加 2cm 无水 Na_2SO_4，使石油醚自由流下，保证其水平高于 Na_2SO_4 平面 0.5cm[注意：色谱柱填充时应避免水分，不要有气泡进入]。将样品提取液加

入色谱柱上,自由流下,待提取液流至柱面时,分次加入石油醚 2mL,洗涤柱壁,再加入石油醚洗脱,收集流出液至黄色带全部流出。流出液经 60℃ 水浴减压蒸馏后,N_2 吹干,定容。

④ 比色法测定同纸层析法。

5. 注意事项

(1) 柱色谱法的优点是在测定胡萝卜素的同时可测定其他类胡萝卜素和色素。类胡萝卜素、色素和胡萝卜素的极性不同,胡萝卜素极性最小先被极性小的石油醚洗脱,增加洗脱液极性(如加入乙醚、丙酮)可先后将极性稍大的类胡萝卜素(如叶黄素、叶红素)、叶绿色洗脱。

(2) 纸层析法和柱色谱法均不能区分 α-、β-和 γ-胡萝卜素,虽然标准品为 β-胡萝卜素,但实际结果为总胡萝卜素。不过天然食品中大部分为 β-胡萝卜素,对结果影响不大。两种方法测定结果相当。

(3) HPLC 的原理、适用范围、样品前处理及操作同纸层析法,浓缩定容后的样品液不经过纸层析,而进入 HPLC 的 C_{18}柱,经流动相洗脱后,用紫外分光光度计检测。HPLC 可分离 α-、β-胡萝卜素并可同时测定多种脂溶性维生素,是目前国内外常用的测定方法。但目前本实验室尚没有建立此法。

第二节 维生素 A 和维生素 E 的测定方法(HPLC)

维生素 A 和维生素 E 广泛存在于食物中。维生素 A 包括所有具有视黄醇生物活性的天然化合物;维生素 E(生育酚)有 4 种主要形式,分别是 α-生育酚、β-生育酚、γ-E、δ-E,其结构如图 4-2、图 4-3。目前维生素 A 和维生素 E 的测定方法是高效液相色谱法,此法能将 α-、γ-生育酚和 δ-生育酚很容易的分开,而且操作方便,快速准确,灵敏度高的特点。因维生素 A 和维生素 E 对光线敏感,易受破坏,因此测定时应避光操作。最小检出量分别为维生素 A: 0.8ng;α-E: 91.8ng;γ-E: 36.6ng;δ-E: 20.6ng。

1. 原理

食物中的维生素 A 及维生素 E 经皂化提取以后,将其不可皂化的部分提取到有机溶剂中。用 HPLC 法测定维生素 A 及维生素 E 的含量。

2. 适用范围

本法适用于各种食物和饲料的测定(GB12388—90)。

3. 仪器

高压液相色谱仪(带紫外检测器)。

六孔恒温水浴锅。

旋转蒸发器。

气瓶、高速离心机。

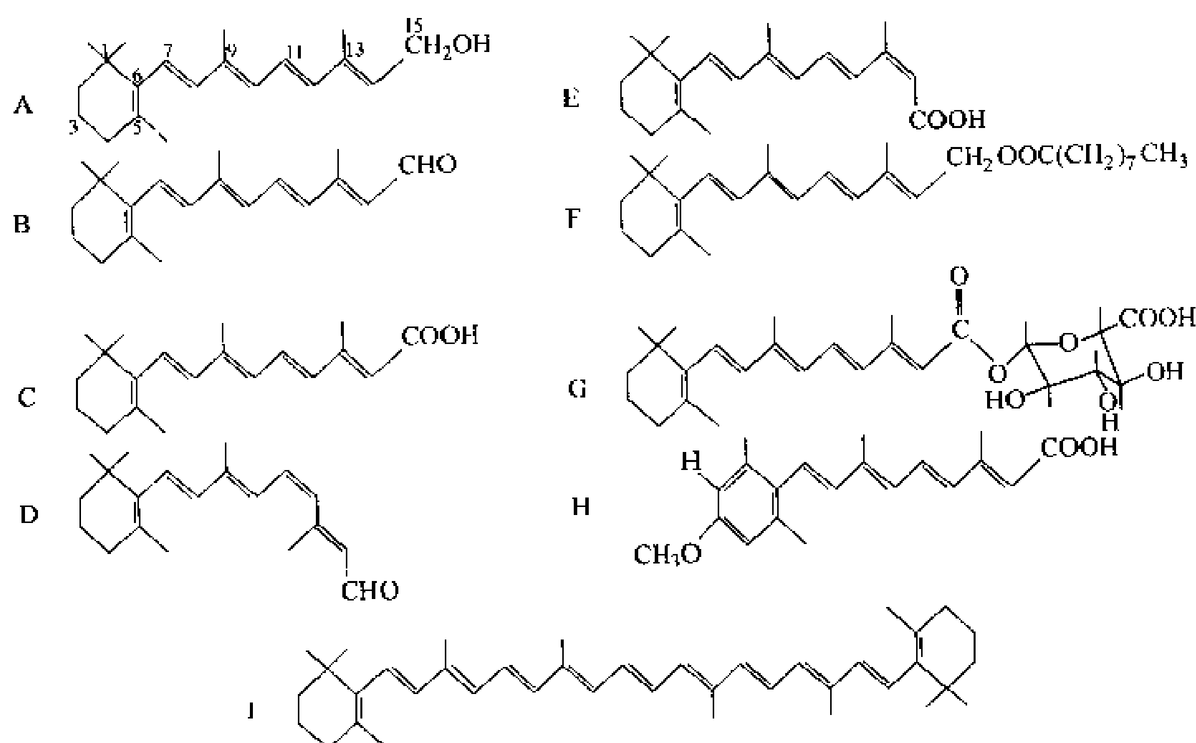
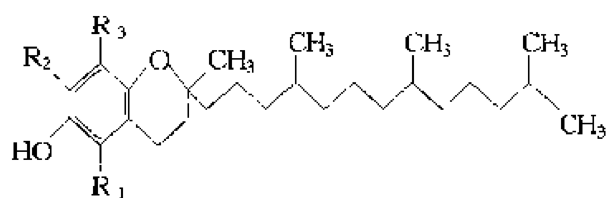


图 4-2 主要的类视黄醇及 β-胡萝卜素的化学结构式

A—全反式视黄醇 B—全反式视黄醛 C—全反式视黄酸 D—11-顺式视黄醛

E—13-顺式视黄酸 F—全反式棕榈酸视黄酯 G—全反式视黄酰 β-葡糖苷酸

H—全反式视黄酸的三甲基甲氧酚类似物(ctretin, acitretin) I—全反式 β-胡萝卜素



化合物	R_1	R_2	R_3
α-生育酚	CH_3	CH_3	CH_3
β-生育酚	CH_3	H	CH_3
γ-生育酚	H	CH_3	CH_3
δ-生育酚	H	H	CH_3

图 4-3 各种生育酚的化学结构

4. 试剂

本实验所用试剂皆为分析纯,所用水皆为蒸馏水。

(1) 无水乙醇:重蒸,不含有醛类物质。

① 检查方法：取 2mL 银氨溶液于试管中，加入少量乙醇，摇匀，再加入10% NaOH 溶液，加热，放置冷却后，若有银镜反应则表示乙醇中有醛。

② 脱醛方法：取 2g 硝酸银溶于少量水中。取 4g 氢氧化钠溶于温乙醇中。将两者倾入 1L 乙醇中，振摇后，放置暗处 2d（不时摇动，促进反应），经过滤，置蒸馏瓶蒸馏，弃去初蒸出的 50mL。当乙醇中含醛较多时，硝酸银用量适当增加。

（2）100g/L 抗坏血酸溶液临用前配制。

（3）氢氧化钾溶液(KOH)(1+1)。

（4）无水乙醚：重蒸，不含过氧化物。

① 过氧化物检查方法：用 5mL 乙醚加 1mL10% 碘化钾溶液，振摇 1min，如有过氧化物则放出游离碘，水层呈黄色或加 4 滴 0.5% 淀粉液，水层呈蓝色。该乙醚需处理后使用。

② 去除过氧化物的方法：重蒸乙醚时，瓶中放入铁丝或铁末少许。弃去10% 初馏液和 10% 残馏液。

（5）pH1～14 试纸。

（6）无水硫酸钠(Na_2SO_4)。

（7）甲醇：色谱纯或分析纯重蒸后使用。

（8）重蒸水：蒸馏水中加入少量高锰酸钾重蒸后使用。

（9）苯并[e]芘标准液：称取苯并[e]芘（纯度 98%），用脱醛乙醇配制成 1mL 相当于 5μg 苯并[e]芘的内标溶液。

（10）维生素 A 标准液：视黄醇（纯度 85% Sigma 公司）用脱醛乙醇溶解维生素 A 标准品，使其浓度大约为 1mL 相当于 1mg 视黄醇。临用前用紫外分光光度法标定其准确浓度。

维生素 E 标准液：α－生育酚（纯度 95% Sigma 公司），δ－生育酚（纯度 95% Sigma 公司），δ－生育酚（纯度 95% Sigma 公司）。用脱醛乙醇分别溶解以上三种维生素 E 标准品，使其浓度大约为 1mL 相当于 1mg。临用前用紫外分光光度法分别标定此三种维生素 E 的准确浓度。

5. 操作步骤

本实验需避光操作。

（1）样品皂化：称取样品于三角瓶中，加 30mL 无水乙醇，振摇三角瓶，使样品分散均匀。加入 5mL100g/L 试剂的(2)抗坏血酸和苯并[e]芘标准液 2mL，混匀。最后加入 10mL(1+1)500g 水+500mL KOH 边加边振摇。于沸水浴上回流 30min 使样品皂化完全。皂化后立即放入冰水中冷却。

（2）样品萃取：将皂化后的样品移入分液漏斗中，用 50mL 水分 2 次洗皂

化瓶,洗液并入分液漏斗中。用 100mL 无水乙醚分 2 次洗皂化瓶及残渣,乙醚液并入分液漏斗中。轻轻振摇分液漏斗 2min,静置分层,弃去水层。然后每次用约 100mL 水将乙醚液洗至中性,约 4~5 次。

(3) 浓缩:将乙醚提取液经无水硫酸钠(约 5g)滤入 150mL 旋转蒸发瓶内,用约 15mL 乙醚冲洗分液漏斗及无水硫酸钠 2 次,并入蒸发瓶内,并将其接在旋转蒸发器上,于 55℃ 水浴中减压蒸馏并回收乙醚,待瓶中乙醚剩下约 2mL 时,取下蒸发瓶,立即用氮气将乙醚吹干。加入 2mL 乙醇溶液,充分混合、溶解提取物。将乙醇液移入塑料离心管中,于离心机上以 3000r/min 离心 5min。上清液供色谱分析。

(4) 标准曲线的制备:将维生素 A 和维生素 E 标准品配置成标准溶液(约 1mg/mL),制备标准曲线前用紫外分光光度法标定其准确浓度。

标准浓度的标定方法:取维生素 A 和维生素 E 标准液若干微升,分别稀释至 10.00mL 乙醇中,并分别按给定波长测定各维生素的吸光值。用比吸光系数计算该维生素的浓度。测定条件如下:

标　准	比吸光系数 $E_{cm}^{1\%}$	波长 λ/nm
视黄醇	1835	325
α-生育酚	71	294
γ-生育酚	92.8	298
δ-生育酚	91.2	298

计算:

$$\rho = A/V \times 1/100 \times 10.00/S \times 10^{-3}$$

式中　ρ——某维生素浓度,mg/mL;

A——维生素的平均紫外吸光值;

V——加入标准的量,μL;

$10.00/S \times 10^{-3}$——标准液稀释倍数。

本法采用内标两点法进行定量。把一定量的维生素 A、维生素 E 及内标苯并[e]芘液混合均匀,选择合适的灵敏度,使上述物质的各峰高约为满量程的 70%,作为高浓度点,高浓度的 1/2 为低浓度点(内标苯并[e]芘的浓度值不变),用此两种浓度的混合标准进行色谱分析。根据微处理机装置,按说明用两点内标法进行定量。

(5) 液相色谱分析:

仪器所需条件:

预柱:ODS10μm,4mm×4.5cm。

分析柱:ODS5μm,4.6mm×25cm。

流动相：甲醇:水＝98:2。混匀，临用前脱气。

紫外检测器波长：300nm。量程0.02。

进样量：20μL进样定量环。

流速：1.65～1.70mL/min。

6．计算

$$x = \rho / m \times V \times 100/1000$$

式中 x——某种维生素的含量，mg/100g；

ρ——由标准曲线上查到某种维生素含量，μg/mL；

V——样品浓缩定容体积，mL；

m——样品质量，g。

用微处理机二点内标法进行计算时，按计算公式计算或由微机直接给出结果。

7．注意事项

（1）维生素A极易被破坏，实验操作应在微弱光线下进行，或用棕色玻璃仪器。

（2）在皂化过程中，应每5min摇一下皂化瓶，使样品皂化完全。

（3）提取过程中，振摇不应太剧烈，避免溶液乳化而不易分层。

（4）洗涤时，最初水洗轻摇，逐次振摇强度可增加。

（5）无水硫酸钠如有结块，应烘干后使用。

（6）在旋转蒸发时，乙醚溶液不应蒸干，以免被测样品含量有损失。

（7）用高纯氮吹干时，氮气不能开的太大，避免样品吹出瓶外结果偏低。

第三节　维生素A测定方法(比色法)

1．原理

维生素A在三氯甲烷中与三氯化锑相互作用，产生蓝色物质，其深浅与溶液中所含维生素A的含量成正比。该蓝色物质虽不稳定，但在一定时间内可用分光光度计于620nm波长处测定其吸光度。

2．仪器

（1）实验室常用设备。

（2）分光光度计。

（3）回流冷凝装置。

3．试剂

本实验所用试剂皆为分析纯，所用水皆为蒸馏水。



（1）无水硫酸钠（Na_2SO_4）。

（2）乙酸酐。

（3）乙醚：不含有过氧化物。

（4）无水乙醇：不含有醛类物质。

（5）三氯甲烷：应不含分解物，否则会破坏维生素A。

检查方法：三氯甲烷不稳定，放置后易受空气中氧的作用生成氯化氢和光气。检查时可取少量三氯甲烷置试管中加水振摇，使氯化氢溶到水层。加入几滴硝酸银溶液，如有白色沉淀即说明三氯甲烷中有分解产物。

（6）25%三氯化锑－三氯甲烷溶液：用三氯甲烷配制25%三氯化锑溶液，储于棕色瓶中[注意：避免吸收水分]。

（7）0.5mol/L KOH溶液（1＋1）。

（8）维生素A标准液：视黄醇（纯度85% Sigma公司）用脱醛乙醇溶解维生素A标准品，使其浓度大约为1mL相当于1mg视黄醇。临用前用紫外分光光度法标定其准确浓度。

（9）酚酞指示剂：用95%乙醇配制1%溶液。

4．操作步骤

维生素A极易被光破坏，实验操作应在微弱光线下进行。

（1）样品处理：根据样品性质，可采用皂化法或研磨法。

① 皂化法：

皂化：根据样品中维生素A含量的不同，称取0.5～5g样品于三角瓶中，加入20～40mL无水乙醇及10mL 1:1氢氧化钾，于电热板上回流30min至皂化完全为止[注意：皂化法适用于维生素A含量不高的样品，可减少脂溶性物质的干扰，但全部实验过程费时，且易导致维生素A损失]。

提取：将皂化瓶内混合物移至分液漏斗中，以30mL水洗皂化瓶，洗液并入分液漏斗。如有渣子，可用脱脂棉漏斗滤入分液漏斗内。用50mL乙醚分2次洗皂化瓶，洗液并入分液漏斗中。振摇并注意放气，静置分层后，水层放入第二个分液漏斗内。皂化瓶再用约30mL乙醚分2次冲洗，洗液倾入第二个分液漏斗中。振摇后，静置分层，水层放入三角瓶中，醚层与第一个分液漏斗合并。重复至水液中无维生素A为止。

洗涤：用约30mL水加入第一个分液漏斗中，轻轻振摇，静置片刻后，放去水层。加15～20mL 0.5mol/L氢氧化钾液于分液漏斗中，轻轻振摇后，弃去下层碱液，除去醚溶性酸皂。继续用水洗涤，每次用水约30mL，直至洗涤液与酚酞指示剂呈无色为止（大约洗涤3次）。醚层液静置10～20min，小心放出析出

的水。

浓缩：将醚层液经过无水硫酸钠滤入三角瓶中，再用约25mL乙醚冲洗分液漏斗和硫酸钠2次，洗液并入三角瓶内。置水浴上蒸馏，回收乙醚。待瓶中剩约5mL乙醚时取下，用减压抽气法至干，立即加入一定量的三氯甲烷使溶液中维生素A含量在适宜浓度范围内。

② 研磨法：

研磨：精确称2～5g样品，放入盛有3～5倍样品质量的无水硫酸钠研钵中，研磨至样品中水分完全被吸收，并均质化[注意：研磨法适用于每克样品维生素A含量大于5～10μg样品的测定，如肝样品的分析。此法步骤简单，省时，结果准确]。

提取：小心地将全部均质化样品移入带盖的三角瓶内，准确加入50～100mL乙醚。紧压盖子，用力振摇2min，使样品中维生素A溶于乙醚中。使其自行澄清（大约需1～2h），或离心澄清[注意：因乙醚易挥发，气温高时应在冷水浴中操作。装乙醚的试剂瓶也应事先置于冷水浴中]。

浓缩：取澄清提取乙醚液2～5mL，放入比色管中，在70～80℃水浴上抽气蒸干。立即加入1mL三氯甲烷溶解残渣。

(2) 标准曲线的制备：准确取一定量的维生素A标准液于4～5个容量瓶中，以三氯甲烷配制标准系列。再取相同数量比色管顺次取1mL三氯甲烷和标准系列使用液1mL，各管加入乙酸酐1滴，制成标准比色列。于620nm波长处，以三氯甲烷调节吸光度至零点，将其标准比色列按顺序移入光路前，迅速加入9mL25%三氯化锑-三氯甲烷溶液。于6s内测定吸光度，将吸光度为纵坐标，以维生素A含量为横坐标绘制标准曲线图。

(3) 样品测定：于一比色管中加入10mL三氯甲烷，加入1滴乙酸酐为空白液。另一比色管中加入1mL三氯甲烷，其余比色管中分别加入1mL样品溶液及1滴乙酸酐。其余步骤同标准曲线的制备。

5. 计算

$$x = \rho/m \times V \times 100/1000$$

式中 x——样品中含维生素A的量，mg/100g（如按国际单位，每1国际单位=0.3μg维生素A）；

ρ——由标准曲线上查得样品中含维生素A的含量，μg/mL；

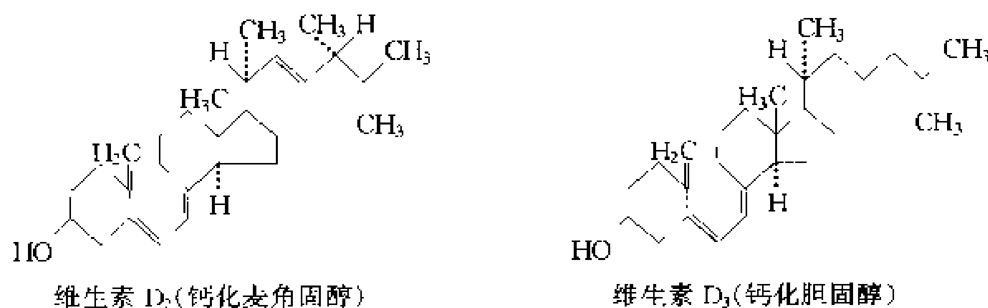
m——样品质量，g；

V——提取后加三氯甲烷定量之体积，mL；

100——以每100g样品计。

第四节 维生素D的测定方法(高效液相色谱法)

维生素D又称钙(或骨)化醇,系类固醇的衍生物,是一类关系钙、磷代谢的活性物质。自然界中以多种形式存在,如维生素 D_2、维生素 D_3、维生素 D_4、维生素 D_5、维生素 D_6、维生素 D_7 等,至少有10种,但主要以维生素 D_2 和维生素 D_3 对动物和人类有营养意义,最为重要,其结构见图4-4。强化食品中强化的维生素D也是维生素 D_2 或维生素 D_3,食物中也是主要测定维生素 D_2 和维生素 D_3。由于维生素D不稳定,测定方法复杂,变异大、受影响因素多等特点,目前维生素测定方法主要采用高效液相色谱法。



维生素 D_2(钙化麦角固醇)　　维生素 D_3(钙化胆固醇)

分子式为: $C_{28}H_{44}O$ 相对分子质量396.66　　分子式为: $C_{27}H_{44}O$ 相对分子质量384.65

图 4-4 部分维生素D结构式

1. 原理

样品中脂溶性维生素在皂化过程中与脂肪分离,以石油醚萃取后,用正相色谱柱提取富集,用反相色谱柱,紫外检测器定量测定。

2. 适用范围

本方法来源于GB/T 5413.9—1997,婴幼儿配方食品和乳粉维生素A、维生素D、维生素E的测定。适用于食品或强化食品及饲料中的维生素D含量的测定。

3. 主要仪器

(1) 高压液相色谱仪,具有可变波长的紫外检测器,数据处理系统或记录仪。

(2) 旋转蒸发器。

(3) 平底烧瓶: 250mL。

(4) 分液漏斗: 500mL。

4. 试剂

所有试剂,如未注明规格,均指分析纯,所有实验用水均指蒸馏水。

(1) 异丙醇: 色谱纯。

（2）2%焦性没食子酸乙醇溶液：取2g焦性没食子酸溶于100mL无水乙醇中。

（3）75%氢氧化钾溶液：取75g氢氧化钾溶于100mL水中。

（4）石油醚：沸程30～60℃

（5）甲醇：色谱纯。

（6）正己烷：色谱纯。

（7）环己烷：色谱纯。

（8）维生素D标准溶液

维生素D_2标准贮备液：含维生素$D_2$100μg/mL的甲醇溶液。称取10mg的维生素D_2，用甲醇定容于100mL容量瓶中。

维生素D_3标准贮备液：含维生素$D_3$100μg/mL的甲醇溶液。称取10mg的维生素D_3，用甲醇定容于100mL容量瓶中。

维生素D标准工作液，其中维生素D_2、维生素D_3的质量浓度均为1μg/mL。取维生素D_2标准贮备液1mL，维生素D_3标准贮备液1mL于100mL容量瓶中，用甲醇定容。

5．操作步骤

（1）样品处理：准确称取10g样品，于250mL平底烧瓶中，加30mL蒸馏水。

（2）测定液的制备：

① 于上述样品溶液中加入100mL的20%没食子酸乙醇溶液，充分混匀后加50mL 75%氢氧化钾溶液，在蒸汽浴上连续回流30min后，立刻冷却到室温。

② 将皂化液转入一500mL分液漏斗中，用100mL水分几次冲洗平底烧瓶。洗涤液并入分液漏斗中。

③ 于上述分液漏斗中，加入100mL石油醚，盖好瓶塞，倒置分液漏斗并剧烈振摇1min。在振摇过程中，注意释放瓶内压力。静置分层，将水相放入另一500mL分液漏斗中，重复上述萃取过程2次，合并醚液到第一个分液漏斗中。用蒸馏水洗该醚液至中性，通过无水硫酸钠过滤干燥，在40℃和氮气流下，于旋转蒸发器上蒸至近干（绝不允许蒸干）后，用石油醚转移至10mL容量瓶中，定容。

④ 从上述容量瓶中取7mL放入一试管中，用氮气将石油醚吹干，于试管中加1mL正己烷。

（3）测定：

① 测定液的制备：

a．仪器条件：

色谱柱：30cm×4mm，硅胶柱。

流动相：正己烷与环己烷按体积比1∶1混合，并按体积分数0.8%加

入异丙醇。

流速：1mL/min。

波长：265nm。

柱温：20℃。

灵敏度：0.005AU/MV。

注射体积：200μL。

b. 注射50μL维生素D标样和200μL样品溶液，根据维生素D标样保留时间收集维生素D于试管中，将试管用氮气吹干，准确加入0.2mL甲醇溶解。

② 测定步骤：

a. 仪器条件：

色谱柱：4.6mm×25cm，C_{18}或具同等性能的色谱柱。

流动相：甲醇。

流速：1mL/min。

波长：265nm。

柱温：20℃。

灵敏度：0.005AU/MV。

注射体积：50μL。

b. 注射50μL维生素D标准溶液，注射50μL样品溶液，得到标样和样品溶液中维生素D峰面积或峰高。

6. 计算

$$x = \frac{\rho_s \times 10/7 \times 40 \times 100}{m} \tag{1}$$

$$\rho_s = \frac{A_s}{A_{sd}} \times \rho_{sd} \tag{2}$$

式中 x——样品中维生素D，mg/100g；

m——称样量，含量，IU/100g；

ρ_s——进样液中维生素D的浓度，μg/mL；

A_s——进样液中维生素D的峰高（或峰面积）；

A_{sd}——标样中维生素D的峰高（或峰面积）；

ρ_{sd}——标样中维生素D的浓度，μg/mL。

计算结果精确至小数点后一位。

7. 举例

如称取AD钙奶10.8g，经皂化、提取后，测得维生素D峰面积为18629，标样峰面积为24767，带入公式计算，得出AD钙奶含维生素D为398.0IU/100g。

8. 注意事项

(1) 允许误差及最小检出量：同一样品的2次测定值之差不得超过2次测定平均值的10%；最小检出量为0.1国际单位。

(2) 试剂焦性没食子酸容易变性，应购买近期生产的试剂。

(3) 如果皂化不完全，可适当增加氢氧化钾的加入量。

第五节 维生素K的测定方法

维生素K是一种脂溶性维生素，它具有多种衍生物，自然界中有叶绿醌系维生素K_1(Phylloquinone)、甲萘醌系维生素K_2(Menaquinone)，另外还有人工合成的维生素K_3(Menadione)等。维生素K对热比较稳定，但遇光和强碱易分解，在空气中可被缓慢氧化。其结构中具有2－甲基1,4－萘醌的结构(见图4－5)。

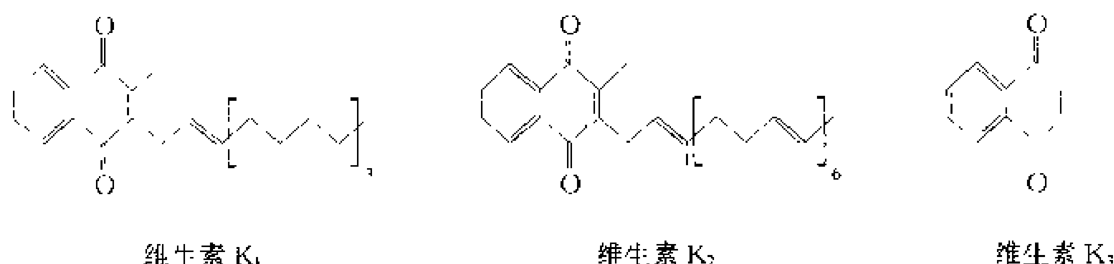


图 4－5 部分维生素K结构式

近几十年来，维生素K的测定由20世纪30年代的生物测定法发展到如今，已有TLC法、GC法、分光光度法、荧光法、电化学法、HPLC法等等。其中HPLC法具有灵敏度、精密度较高、分离效果好、分析速度快等优点成为分析维生素K的主要方法，尤其是维生素K_1。维生素K_1主要存在于天然绿叶蔬菜及动物内脏中，是维生素K检测的主要目标物。维生素K_3多用于强化食品和饲料，也是产品质量监督中常被检测的物质；维生素K_2主要由细菌合成，食物中含量较少。这里只介绍蔬菜中维生素K_1的测定方法和食物及饲料中维生素K_3的测定。

一、蔬菜中维生素K_1的测定方法(HPLC法)

天然维生素K_1遇碱易分解，常规的皂化处理可严重破坏样品中的维生素K_1，本方法参考AOAC方法中维生素D的前处理过程，选用磷酸盐处理过的氧化铝进行色谱分离，然后进行HPLC分析，提高了分离效果。

1. 原理

蔬菜中的维生素 K_1 经有机溶剂提取后，经失活的磷酸盐处理过的氧化铝色谱柱进行净化，再用液相色谱法将维生素 K_1 分离并进行定性定量测定。

2. 适用范围

本标准适用于各类蔬菜、绿色植物及其干制品中维生素 K_1 的测定。

3. 仪器

（1）实验室常用设备。

（2）打碎机。

（3）202－R 型恒温干燥箱。

（4）色谱柱：为 0.8cm×30cm 的玻璃柱，底端收缩变细，并装有活塞，活塞上约 1cm 处有一玻璃筛板，筛板孔径为 16～30μm，柱上端膨大为体积约 30mL 的贮液池。使用前需干燥。

（5）旋转蒸发器。

与旋转蒸发器配套的旋转蒸发瓶：具塞，圆底，体积为 150mL。

（6）恒温水浴锅。

（7）高纯氮气。

（8）高速离心机。

与高速离心机配套的小离心管：具塞，体积为 1.5～3.0mL。

（9）紫外分光光度计。

（10）HPLC 高效液相色谱仪，带紫外检测器。

4. 试剂

除特殊说明实验用水为蒸馏水，试剂为分析纯，有机溶剂使用前需重新蒸馏。

（1）无水 Na_2SO_4：使用前需在 150℃ 的烘箱内烘烤 4～8h 以去除水分。

（2）0.14mol/L Na_2SO_4 溶液：称取 20g 无水硫酸钠，用蒸馏水溶解后定容至 1L。

（3）丙酮：分析纯。

（4）石油醚：沸程 30～60℃，分析纯。

（5）0.6mol/L 碘化钾溶液：称取 10g 碘化钾，用蒸馏水溶解定容至 100mL。

（6）5g/L 淀粉液：称取 0.5g 可溶性淀粉，用水溶解定容至 100mL。

（7）乙醚：分析纯。不含过氧化物。

① 过氧化物的检查方法：用 5mL 乙醚加 1mL 0.6mol/L 碘化钾溶液，振摇 1min，如有过氧化物则放出游离碘，水层呈黄色。或加 4 滴 5g/L 淀粉液，水层呈蓝色。则该乙醚含有过氧化物需处理后使用。

② 去除过氧化物的方法：重蒸时瓶中加一段纯铁丝，弃去10%初馏液和10%残留液。

(8) 洗脱液：石油醚+乙醚(97+3)。

(9) 甲醇：优级纯。

(10) 正己烷：优级纯。

(11) 磷酸氢二钠：分析纯。

(12) 中性氧化铝：100～200目。

(13) 氧化铝的处理：

① 磷酸盐处理氧化铝：取250g中性氧化铝，20g磷酸氢二钠，1.6L蒸馏水，放入体积为2L的锥形瓶中沸水浴30min，不时摇动或搅拌。冷却，倒掉上层液体(包括悬浮的细小颗粒)，然后用布氏漏斗抽滤。将残留物转至平底玻璃皿中，于150℃干燥箱中烘烤3～5h至2次称量相差3g以下，烘烤过程中不时搅拌，以避免结块，冷却后放入干燥器中保存。

② 失活处理氧化铝：使用前，将磷酸盐处理的氧化铝，加入具塞锥形瓶中。每100g氧化铝加9.0mL去离子水，盖紧瓶塞，蒸汽浴或80℃干燥箱加热3～5min，剧烈摇动锥形瓶，使氧化铝可以自由流动，无结块。冷却，静置30min，使水分分布均匀。

③ 验证处理过的氧化铝：取标准应用液1.0mL，用氮气吹干，再用石油醚溶解定容至1.0mL。然后按5(3)装柱，将标准溶液加入柱上，按5.(4)净化步骤进行柱色谱，用旋转蒸发瓶收集洗脱流出液，浓缩，氮气吹干，用正己烷定容至1.0mL，HPLC测定，记录峰面积或峰高(A)。另取标准应用液直接测定，记录峰面积或峰高(A_r)。将A与A_r进行比较，其值在0.97～1.03之间(A/A_r)，则说明柱效较好，氧化铝处理合格。否则需重新进行失活处理。如果再次验证比值仍不能达到0.97，则需重新制备氧化铝。

(14) 维生素K_1标准：Sigma公司，纯度>98%。

(15) 标准贮备液：精确称取50.0mg维生素K_1标准，用正己烷溶解定容至50.0mL，即1.0mg/mL。将贮备液分装成安瓿，冷冻保存。

(16) 标准工作液：取标准贮备液，用正己烷准确稀释50倍，即20.0μg/mL。

标准工作液的标定：取标准应用液测定紫外吸光值，波长248nm，比色杯厚度1cm，以正己烷为空白，测定3次，取平均值，按下式计算标准应用液浓度。

$$\rho = \frac{A}{E} \times M_r \times 10^3$$

式中 ρ——维生素K_1标准应用液浓度，μg/mL；

A——标准应用液平均紫外吸光值；

E——摩尔消光系数,20000;

M_r——维生素 K_1 相对分子质量 450.7;

10^3——换算成 μg/mL 的换算系数。

5. 操作步骤(所有操作均需避光进行)

(1) 样品处理:

① 新鲜蔬菜:拣净去杂物,将可食部洗净,擦去表面水分,切碎,用打碎机制备成匀浆。

② 干制植物性样品:磨碎,过 60 目筛。

(2) 样品提取:

① 称取已打成匀浆的新鲜样品 2~10g(维生素 K_1 含量不低于 2μg),加到具塞锥形瓶中,再加入 5~10 倍体积的丙酮,盖上塞子,振摇 3~5min,静置 1min,以下按 5.(3)步骤操作。

② 称取干制植物性样品 0.2~4g(维生素 K_1 含量不低于 2μg),加到研钵中,再加入 2~4 倍于样品量的无水 Na_2SO_4 研磨均匀后,加入 25mL 丙酮,研磨 3~5min,静置 1min。

[注意:对于细胞壁比较厚的样品,如藻类食品,可先用石英砂研磨,破坏植物组织细胞。石英砂需进行预处理,将石英砂用 20 目筛子过筛之后,先用浓盐酸浸泡,然后再用稀氢氧化铵浸泡,最后用蒸馏水洗至中性后在烘箱中烤干。使用时,每 10g 样品加 3~5g 石英砂于研钵中研磨。]

(3) 洗涤:将上部澄清液倒入已装有 50~100mL 0.14mol/L Na_2SO_4 溶液的分液漏斗中,残渣再用丙酮提取 2~3 次,每次用量不少于 25mL,上清液并入分液漏斗。残渣继续用石油醚洗涤 3~4 次,每次用量约 25mL,至洗涤液呈无色,将洗涤液倒入同一分液漏斗中,振摇 1min,静置。弃水相,有机相用蒸馏水洗涤 4~5 遍,至水相澄清。弃水相,将有机相经无水 Na_2SO_4 脱水后转至旋转蒸发瓶中,于 60℃ 水浴中减压蒸馏至约 2mL 时取下,立即用氮气吹干,用石油醚定容至 2.0mL,待净化。

(4) 装柱:取干燥色谱柱,将验证好的氧化铝浸泡于石油醚中,湿法填充于色谱柱,使氧化铝自由均匀流下,至柱高为 20cm,其上端再加 2cm 无水 Na_2SO_4。打开活塞,调整流速为每秒 1 滴。一根色谱柱只用于一个样品测定。

(5) 色谱净化:待石油醚流至柱上端 0.5cm 时,加 V_1mL 样品提取液,当样品液流至柱平齐时,加 2mL 石油醚冲洗柱壁,流下。再加 10mL 石油醚洗脱,2 次,弃除流出液。然后,用 30mL 洗脱液洗脱,用旋转蒸发瓶收集流出液。流出液于旋转蒸发器浓缩近干,取下用氮气吹干后,用正己烷定容为 V_2mL。将定容液移入小塑料离心管中,5000r/min 离心 5min,上清液供 HPLC 分析。

(6) 标准工作曲线的绘制:分别取维生素 K_1 标准应用液 0.5、1.0、2.0、

4.0、6.0、8.0、10.0mL，加入分液漏斗中，按5.(2)步骤提取，浓缩定容至2.0mL。取1.0mL标准提取液按5.(4)步骤操作，最后定容至1.0mL，即标准工作曲线中各点维生素 K_1 含量分别相当于5、10、20、40、60、80、100μg/mL。然后再按5.(6)条件进行HPLC测定，记录峰面积或峰高。以标准含量为横坐标，峰面积或峰高为纵坐标绘制标准工作曲线。

(7) HPLC色谱分析：

色谱条件(推荐条件)：

预柱 ultrapack ODS，10μm，4.0mm×4.5cm。

分析柱：ultrasphere ODS，C_{18}，5μm，4.6mm×250mm。

流动相：甲醇＋正己烷(98＋2)。混匀，临用前脱气。

进样量：20μL。

流速 1.5mL/min。

紫外检测器：波长248nm。量程0.01～0.05。

HPLC稳定性的测定：取标准应用液连续进行6次HPLC测定，计算峰面积或峰高的平均值、标准差和RSD%，如果RSD＜1%，说明仪器稳定性良好。仪器稳定后方可进行样品测定。

(8) 样品分析：取样品净化液20μL，按5.(6)条件进行定性、定量测定。

① 定性：用标准色谱峰的保留时间定性。

② 定量：用样品峰面积或峰高在标准工作曲线上查出其相应的维生素 K_1 含量，或用回归方程求出其含量。

6. 计算

$$x=\frac{m_1\times 2\times V_2\times 100}{V_1\times m}$$

式中 x——样品中维生素 K_1 的含量，μg/100g；

m_1——由标准工作曲线上查出或回归方程求出的维生素 K_1 含量，μg；

2——样品提取后的定容体积，mL；

V_1——样品净化处理时的取液量，mL；

V_2——样品净化后的定容体积，mL；

m——样品质量，g。

7. 注意事项

(1) 允许差及最小检出量：同一实验室同时或连续2次测定结果相对偏差绝对值≤10%，本法最小检出限为0.5mg。

(2) 本方法避免使用皂化处理，减少了维生素 K_1 的破坏；利用失活的磷酸盐处理过的氧化铝进行色谱分离，通过改变洗脱液的极性使维生素 K_1 与杂质

分离，有利于高效液相色谱对维生素 K_1 的定性及定量分析。

(3) 维生素 K_1 具有很强的亲脂性，溶于丙酮、石油醚、正己烷、异辛烷等溶剂中，而不易溶于甲醇、乙醇等溶剂中。当样品中含有较多的水分时，如直接用石油醚或正己烷提取会使样品变黏，因此，样品需先用丙酮提取，或先用无水 Na_2SO_4 研磨，然后再用丙酮提取，可起到吸收水分的作用，进一步地破坏样品的细胞组织，使提取效果更佳。

(4) 以往的报告多选用活性硅胶或中性氧化铝做色谱柱分离维生素 K_1，再用极性小的有机溶剂作洗脱液。实际工作中发现，用硅胶色谱柱，洗脱流速慢，洗脱液用量大，分离时间较长；用未经处理的氧化铝色谱柱分离会出现维生素 K_1 与干扰物分离不清的现象。当氧化铝用磷酸盐处理后，氧化铝的极性增强，使吸附较小的维生素 K_1 易于被洗脱液洗脱出来，而且在处理后的氧化铝中加入少量水分可以提高柱效，减少维生素 K_1 出峰拖尾的现象，缩短保留了时间，避免了因使用氧化铝造成的维生素 K_1 可能分解的现象。

(5) 如果氧化铝色谱柱柱效良好，首先被石油醚洗脱出来的应是胡萝卜素，且柱上没有胡萝卜素黄色带扩散的现象；叶绿素及其他色素停留在色谱柱的上方没有或仅有少量位移但不影响分离效果。

(6) 洗脱液中乙醚含量的多少影响着洗脱液的极性，如果乙醚含量少，可使维生素 K_1 的保留时间延长，反之，会使干扰物质被提前洗脱，影响净化效果。所以应严格控制洗脱液中乙醚的比例。

(7) 根据标准维生素 K_1 紫外扫描图谱，可见维生素 K_1 于 240、248、260、269nm 波长处有 4 个特征峰，其中 260nm 的峰最低。将标准品用 HPLC 测定，以 260nm 波长下的峰面积为 1，则 240、248nm 和 269nm 波长下的峰面积分别为 1.15、1.23、1.09。

(8) 一般反相色谱，多用有极性的甲醇作为流动相。在甲醇中加入适量的非极性有机溶剂（如正己烷、异辛烷等），可以增加维生素 K_1 的溶解能力，有利于缩短保留时间，减少出峰拖尾现象。本方法选择甲醇 + 正己烷(98 + 2)作为流动相，维生素 K_1 的保留时间为(15.6 ± 0.1)min。

(9) 本方法最小检测限为 0.5μg/mL，在 1.0 ~ 100.0μg/mL 范围内与峰面积有良好的线形关系。批间测定结果的相对标准偏差在 1.3% ~ 7.1%（$n = 6$）；回收率为 90.9% ~ 106.3%。不同实验室间测定结果表明此方法精密度、重现性较好，净化效果好，试剂价格适中。

二、食物及饲料中水溶性维生素K_3(甲萘醌)的测定方法

1．原理

在氨存在的条件下维生素K_3(甲萘醌，VK_3)与氰乙酸乙酯形成蓝紫色物质，在575nm下的吸光度值与维生素K_3的浓度成正比，用分光光度计测定有色物质的吸光度值，定量分析样品中维生素K_3的含量。本法检出限为0.05mg。

2．适用范围

本方法适用于强化食物及饲料中水溶性维生素K_3的测定。

3．仪器

分光光度计。

4．试剂

本实验所用试剂均为分析级，实验用水为蒸馏水。

(1) 0.1mol/L $\frac{1}{2}I_2$溶液：称取25g KI溶解于20mL水中，加入9.8g碘，混匀溶解，加水至750mL。贮存于棕色瓶中，避光保存24h。

(2) 0.1mol/L $Na_2S_2O_3$：将水煮沸后冷却。称取25g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$溶解于500mL含0.1g Na_2CO_3的冷却水中，并用冷却的水稀释至1000mL。

(3) 淀粉指示剂：称取2g可溶性淀粉，加于10mL水中，摇匀。然后缓慢加至200mL沸水中，煮2min。

(4) 氨水+异丙醇(1+1)溶液：取异丙醇与等体积的浓氨水混合。

(5) 氰乙酸乙酯(30g/L)：取3g氰乙酸乙酯溶解于100mL异丙醇中。

(6) 维生素K_3标准溶液(0.1mg/mL)：准确称取50mg维生素K_3标准品，转至500mL棕色容量瓶中，用异丙醇溶解并定容至刻度。

5．操作步骤

所有操作均需避光进行

(1) 提取：准确称取约15g已混匀的样品，准确加入100mL水，搅拌10min，保证维生素K_3充分溶解与混匀。过滤，如滤液浑浊，则反复过滤至澄清。

(2) 氧化：吸取40mL滤液至100mL容量瓶中，加1～2滴淀粉指示剂，用0.1mol/L碘溶液滴定，至出现持续的蓝色。向溶液中滴入1滴0.1mol/L $Na_2S_2O_3$消除蓝色。用水定容至刻度[注意：碘溶液的作用是作为氧化剂氧化样品中的还原性物质，多余的碘溶液可使淀粉变成蓝色，$Na_2S_2O_3$则是去除多余的氧化剂，消除蓝色，以避免有色物质影响测定]。

(3) 标准管和样品管的制备：分别取2套20mL比色管，分别按下表顺序

加入维生素 K_3 标准溶液、样品提取液及试剂，制备标准管和样品管。

用水定容至 20mL，摇匀，放置 20min。

[注：样品管和标准管中水定容的体积与显色强度、显色的稳定时间密切相关，如果定容体积过少，则色度较弱，且稳定时间短。如按本方法的操作进行，显色反应至少可以稳定 2h]

标准管和样品管的制备　　单位：mL

试剂	标准管					样品管	
	0	1	2	3	4	空白管	测定管
维生素 K_3 标准溶液	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	—	—
样品提取液	—	—	—	—	—	10.0	10.0
异丙醇	3.0	1.50	1.0	0.5	0.0	3.0	2.0
氰乙酸乙酯	—	1.0	1.0	1.0	1.0	—	1.0
氨水－异丙醇	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

(4) 比色测定：用分光光度计于 575nm 波长下，以标准 0 管作空白管，调节仪器零点，测定各管吸光度值。

6. 计算

以标准维生素 K_3 含量作横坐标，吸光度值作纵坐标，绘制标准曲线，并计算回归方程。用样品测定管与空白管吸光度值的差值在标准曲线上查出样品管的维生素 K_3 含量，然后计算出样品中维生素 K_3 的含量。

$$x = \frac{m_{a-b} \times 25}{m} \times 100$$

式中　x——样品中维生素 K_3 的含量，mg/100g；

m_{a-b}——样品测定管与空白管吸光度值的差值在标准曲线上对应的维生素 K_3 含量，mg；

m——样品质量，g；

25——样品稀释倍数。

7. 注意事项

结果的允许差

(1) 同一实验室平行测定或重复测定结果的相对偏差绝对值＜10%。

(2) 天然食物中不含有维生素 K_3，只有部分强化食物可能用维生素 K_3 作为强化剂。有文献报道人工合成维生素 K_3 可能有一定的毒副作用，尽管目前还没有有力的证据支持这一论点，但是现在市场上应用维生素 K_3 作为强化剂的产品较少见。饲料常用维生素 K_3 作为维生素 K 的来源，所以维生素 K_3 的测定对饲料检测和质量控制更有意义。

第五章　水溶性维生素

水溶性维生素包括维生素 B_1(硫胺素)、维生素 B_2(核黄素)、维生素 B_6(吡哆醇,吡哆醛,吡哆铵)、维生素 B_{12}(氰钴胺素)、维生素 PP(烟酸、抗赖皮病因子)、叶酸、泛酸(维生素 B_3、遍多酸)、生物素(维生素 B_7、辅酶 R)、胆碱和维生素 C(抗坏血酸)等。

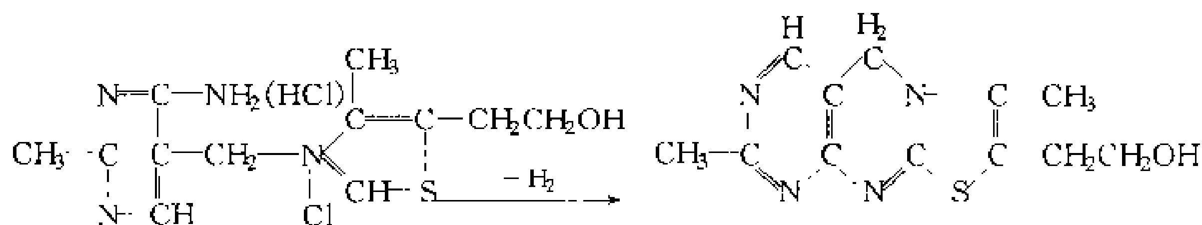
水溶性维生素存在于植物性食物中,都能溶于水,在食物中常以辅酶的多种形式存在。满足组织需要后都能从机体排出。

第一节　维生素 B_1(硫胺素)的测定方法

维生素 B_1 也称硫胺素,在酸性溶液中比较稳定,加热不易分解,而在碱性溶液中极不稳定。紫外线可使硫胺素降解而失活性。铜离子可加快它的破坏。硫胺素在 pH 等于 7 的水溶液中,在 235nm 及 267nm 处有 2 个紫外线吸收高峰。硫胺素测定方法有微生物法和化学法等等,其中化学法又有比色法、荧光法和近年来发展的色谱法。而国内外传统的经典方法和现在国际上比较通用的方法是荧光法。微生物法的缺点是往往有些不是硫胺素的物质(特别是硫胺素本身的分解产物)在实验中与硫胺素有相同的反应,尽管可以用很合适的空白试验加以弥补,却给实验带来了很大的繁琐,同时也增加了系统误差;比色法在分析食物时不多用;而色谱法成本很高易受仪器条件限制不易于推广;荧光法除利用了硫胺素理化上的特异性具有良好的准确性与灵敏度外,在实验室条件和操作技术上也较经济、简便,且所需时间较短,所以国标采用荧光法来测定食物中硫胺素的含量。

1. 原理

硫胺素在碱性铁氰化钾溶液中被氧化成噻嘧色素,在紫外线下,噻嘧色素发出荧光。在给定的条件下,以及没有其他荧光物质干扰时,此荧光的强度与噻嘧色素量成正比,即与溶液中硫胺素量成正比。



如样品中含杂质过多，应经过离子交换剂处理，使硫胺素与杂质分离，然后以所得溶液做测定。

本方法的最小检出限为 0.05μg。

2. 适用范围

GB12390－90　适用于各类食物中硫胺素的测定，但不适用于有吸附硫胺素能力的物质和含有影响噻嘧色素荧光物质的样品。

3. 仪器

（1）电热恒温培养箱。

（2）荧光分光光度计。

4. 试剂

本实验用水均为蒸馏水，试剂不加说明均为分析纯试剂。

（1）正丁醇：分析纯需经重蒸馏后使用。

（2）无水硫酸钠（Na_2SO_4）。

（3）淀粉酶和蛋白酶：国产或进口均可。

（4）0.1mol/L HCl：8.5mL 浓盐酸（相对密度 1.19 或 1.20）用水稀释至1000mL。

（5）0.3mol/L HCl：25.5mL 浓盐酸用水稀释至 1000mL。

（6）2mol/L CH_3COONa 溶液：164g 无水乙酸钠溶于水中稀释至 1000mL。

（7）25%KCl 溶液：250g 氯化钾溶于水中稀释至 1000mL。

（8）25% 酸性 KCl 溶液：8.5mL 浓盐酸用 25% 氯化钾溶液稀释至1000mL。

（9）15%NaOH 溶液：15g 氢氧化钠溶于水中稀释至 100mL。

（10）1%铁氰化钾溶液：1g 铁氰化钾溶于水中稀释至 100mL，放于棕色瓶内保存。

（11）碱性铁氰化钾溶液：取 4mL 1%铁氰化钾溶液，用15%氢氧化钠溶液稀释至 60mL。用时现配，避光使用。

（12）3%乙酸溶液：30mL 冰乙酸用水稀释至 1000mL。

（13）活性人造浮石：称取 200g 40～60 目的人造浮石，以 10 倍于其体积的 3%热乙酸溶液搅洗 2 次，每次 10min；再用 5 倍于其体积的 25%热氯化钾溶液搅洗 15min；然后再用 3%热乙酸溶液搅洗 10min；最后用热蒸馏水洗至没有氯离子。于蒸馏水中保存。

（14）0.04%溴甲酚绿溶液：称取 0.1g 溴甲酚绿，置于小研钵中，加入1.4mL 0.1mol/L 氢氧化钠研磨片刻，再加入少许水继续研磨至完全溶解，用水稀释至 250mL。

(15) 标准液:

① 硫胺素标准贮备液(0.1mg/mL): 准确称取100mg经氯化钙干燥24h的硫胺素,溶于0.01mol/L盐酸中,并稀释至1000mL。于冰箱中避光保存。

② 硫胺素标准中间液(10μg/mL): 将硫胺素标准贮备液用0.01mol/L盐酸稀释10倍,于冰箱中避光保存。

③ 硫胺素标准工作液(0.1μg/mL): 将硫胺素标准中间液用水稀释100倍,用时现配。

5. 操作步骤

(1) 样品制备: 样品采集后用匀浆机打成匀浆于低温冰箱中冷冻保存,用时将其解冻后混匀使用。干燥样品要将其尽量粉碎后备用。

(2) 提取:

① 精确称取一定量试样(估计其硫胺素含量约为10~30μg,一般称取2~10g试样),置于100mL三角瓶中,加入50mL 0.1mol/L或0.3mol/L HCl使其溶解,放入高压锅中加热水解121℃ 30min,凉后取出。

② 用2mol/L乙酸钠调其pH为4.5(以0.04%溴甲酚绿为外指示剂)。

③ 按每1g样品加入20mg淀粉酶和40mg蛋白酶的比例加入淀粉酶和蛋白酶。于45~50℃温箱过夜保温(约16h)。

④ 凉至室温,定容至100mL,然后混匀过滤,即为提取液。

(3) 净化:

① 用少许脱脂棉铺于盐基交换管的交换柱底部,加水将棉纤维中气泡排出,再加约1g活性人造浮石使之达到交换柱的1/3高度。保持盐基交换管中液面始终高于活性人造浮石。

② 用移液管加入提取液20~60mL(使通过活性人造浮石的硫胺素总量约为2~5μg)。

③ 加入约10mL热蒸馏水冲洗交换柱,弃去洗液。如此重复3次。

④ 加入25%酸性氯化钾(温度为90℃左右)20mL,收集此液于25mL刻度试管内,晾至室温,用25%酸性氯化钾定容至25mL,即为样品净化液。

⑤ 重复上述操作,将20mL硫胺素标准使用液加入盐基交换管以代替样品提取液,即得到标准净化液。

(4) 氧化:

① 将5mL样品净化液分别加入A、B两个反应瓶。

② 在避光条件下将3mL 15%氢氧化钠加入反应瓶A,将3mL碱性铁氰化钾溶液加入反应瓶B,振摇约15s,然后加入10mL正丁醇;将A、B 2个反应瓶同时用力振摇1.5min。

③ 重复上述操作，用标准净化液代替样品净化液。

④ 静置分层后吸去下层碱性溶液，加入 2～3g 无水硫酸钠使溶液脱水。

(5) 测定：

① 荧光测定条件：激发波长 365nm，发射波长 435nm，激发波狭缝 5nm，发射波狭缝 5nm。

② 依次测定下列荧光强度：

a. 样品空白荧光强度（样品反应瓶 A）；

b. 标准空白荧光强度（标准反应瓶 A）；

c. 样品荧光强度（样品反应瓶 B）；

d. 标准荧光强度（标准反应瓶 B）。

6. 计算

$$x = (U - U_b) \times \frac{\rho \cdot V}{(S - S_b)} \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{1}{m} \times \frac{100}{1000}$$

式中 x ——样品中硫胺素含量，mg/100g；

U ——样品荧光强度；

U_b ——样品空白荧光强度；

S ——标准荧光强度；

S_b ——标准空白荧光强度；

ρ ——硫胺素标准工作液浓度，μg/mL；

V ——用于净化的硫胺素标准工作液体积，mL；

V_1 ——样品水解后定容之体积，mL；

V_2 ——样品用于净化的提取液体积，mL；

m ——样品质量，g；

$\frac{100}{1000}$ ——样品含量由 μg/g 换算成 mg/100g 的系数。

7. 举例

麸皮 2.019g，共有提取液 100mL，取 20mL 经盐基交换管过滤，得提纯液 25mL。取 5mL 提纯液做测定，得出如下结果：

$U = 52.81$ $S = 45.83$ $U_b = 3.795$ $S_b = 2.692$

$$(52.81 - 3.795) \times \frac{0.1 \times 20}{(45.83 - 2.692)} \times \frac{100}{20} \times \frac{1}{2.019} \times \frac{100}{1000} = 0.56\text{mg/100g}$$

8. 注意事项

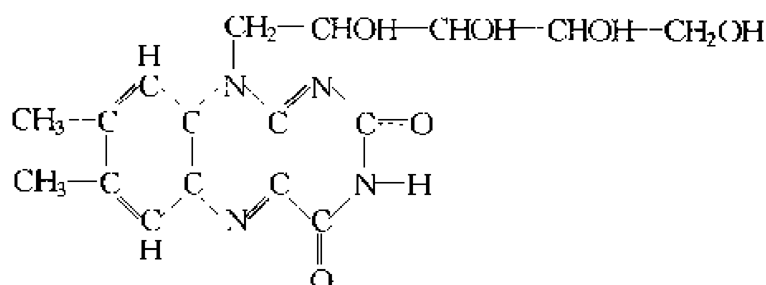
(1) 加热酸性氯化钾而不使其沸的原因是热氯化钾滤速较快，而不沸则是使其不至因过饱和而在洗涤中结晶析出阻塞交换柱。被洗下的硫胺素在酸性氯化钾中极其稳定，可保存一周以上。

（2）硫胺素在碱性环境中被铁氰化钾氧化成噻嘧色素，振摇15s是使其充分反应，这期间应保证黄色不退证明铁氰化钾量充足不被其他还原性杂质耗尽，而强碱又可破坏硫胺素，所以除加入碱性铁氰化钾时边摇匀边加入外，其加入量一定不能过多，否则硫胺素被破坏。

（3）步骤是整个实验的关键，对每个样品所加试剂的次序、快慢、振摇时间等都必须尽量一致，尤其是用正丁醇提取噻嘧色素时必须保证准确振摇90s。

第二节　维生素 B_2（核黄素）的测定方法（硅镁吸附剂净化荧光法）

核黄素也称为维生素 B_2，它的结构式如下：



核黄素是橘黄色无臭的针状结晶，能溶于水而不溶于乙醚、丙酮、氯仿及苯等；在酸性溶液中比较稳定；在碱性溶液中不稳定；易因日光和紫外线的照射而被破坏。核黄素对热很稳定，在中性溶液中于120℃下加热6h破坏也很少，因而食物在烹调过程中单纯的加热因素并不致使核黄素发生显著的损失。

1. 原理

核黄素在440～500nm波长光照射下发生黄绿色荧光。在稀溶液中其荧光强度与核黄素的浓度成正比。利用硅镁吸附剂对核黄素的吸附作用去除样品中的干扰荧光测定的杂质，然后洗脱核黄素，测定其荧光强度。试液再加入低亚硫酸钠（$Na_2S_2O_4$），将核黄素还原为无荧光的物质，再测定试液中残余荧光杂质的荧光强度，两者之差即为食品中核黄素所产生的荧光强度。

2. 适用范围

参照GB 12391—1990，本方法适用于食物及饲料中核黄素的测定。

3. 仪器

（1）高压消毒锅。

（2）电热恒温培养箱。

（3）核黄素吸附柱。

（4）荧光分光光度计。

4．试剂

试验用水为蒸馏水。试剂不加说明者为分析纯。

（1）硅镁吸附剂：60～100 目，Sigma 公司产品。

（2）2.5mol/L 无水乙酸钠溶液。

（3）10%木瓜蛋白酶：用 2.5mol/L 乙酸钠溶液配制。使用时现配制。

（4）10%淀粉酶：用 2.5mol/L 乙酸钠溶液配制。使用时现配制。

（5）0.1mol/L HCl。

（6）1mol/L NaOH。

（7）0.1mol/L NaOH。

（8）200g/L 低 Na_2SO_3 溶液：此液用时现配。

（9）洗脱液：丙酮＋冰醋酸＋水(5＋2＋9)。

（10）0.04%溴甲酚绿指示剂。

（11）3%（体积分数）高锰酸钾溶液。

（12）3%（体积分数）过氧化氢溶液。

（13）核黄素标准液的配制：（纯度＞98%，Sigma 公司）。

① 核黄素标准贮备液：（25μg/mL）将标准品核黄素粉状结晶置于真空干燥器或盛有硫酸的干燥器中。经过 24h 后，准确称取 50mg，置于 2L 容量瓶中，加入 2.4mL 冰乙酸和 1.5mL 水。将容量瓶置于温水中摇动，待其溶解，冷却至室温，稀释至 2L，移至棕色瓶中，加少许甲苯覆盖于溶液表面，于冰箱中保存。

② 核黄素标准使用液：吸取 2.00mL 核黄素标准贮备液，置于 50mL 棕色容量瓶中，用水稀释至刻度。避光，贮于 4℃ 冰箱，可保存一周。此溶液每毫升相当于 1.00μg 核黄素。

5．操作步骤

整个操作过程需避光进行。

（1）样品提取：

① 水解：称取 2～10g 样品（约含 10～200μg 核黄素）于 100mL 三角瓶中，加 50mL 0.1mol/L 盐酸，搅拌直到颗粒物分散均匀。用 40mL 瓷坩埚为盖扣住瓶口，于 121℃ 高压水解样品 30min。水解液冷却后，滴加 1mol/L 氢氧化钠，用 0.04%溴甲酚绿作外指示剂调至 pH 为 4.5。

② 酶解：含有淀粉的水解液：加入 3mL 10%淀粉酶溶液，于 37～40℃ 保温约 16h。含高蛋白的水解液：加 3mL 10%木瓜蛋白酶溶液，于 37～40℃ 约 16h。

（2）过滤：上述酶解液定容至 100.0mL，用干滤纸过滤。此提取液在 4℃ 冰箱中可保存一周。

（3）氧化去杂质：视样品中核黄素的含量取一定体积的样品提取液及核黄素标准使用液（约含 1～10μg 核黄素）分别于 20mL 的带盖刻度试管中，加水至15mL。各管加 0.5mL 冰乙酸，混匀。加 3％高锰酸钾溶液 0.5mL，混匀，放置2min，使氧化去杂质。滴加 3％双氧水溶液数滴，直至高锰酸钾的颜色退掉。振摇试管，使多余的氧气逸出。

（4）核黄素的吸附和洗脱：

① 核黄素吸附柱：硅镁吸附剂约 1g 用湿法装入柱，占柱长 1/2～2/3（约5cm）为宜（吸附柱下端用一团脱脂棉垫上），勿使柱内产生气泡，调节流速约为60 滴/min。

② 过柱与洗脱：将全部氧化后的样液及标准液通过吸附柱后，用约 20mL 热水洗去样液中的杂质，共 3 次。然后用 5.00mL 洗脱液将样品中核黄素洗脱并收集于一带盖 10mL 刻度试管中，再用水洗吸附柱，收集洗出之液体并定容至10mL，混匀后待测荧光。

（5）测定：

① 于激发光波长440nm，发射光波长 525nm 测量样品管及标准管的荧光值。

② 待样品及标准的荧光值测量后，在各管的剩余液（约 5～7mL）中加0.1mL 20％低亚硫酸钠溶液，立即混匀，在 20s 内测出各管的荧光值，作为各自的空白值。

6．计算

$$x = \frac{(A - B) \times m'}{(C - D) \times m} \times f \times \frac{100}{1000}$$

式中 x——样品中含核黄素的量，mg/100g；

A——样品管荧光值；

B——样品管空白荧光值；

C——标准管荧光值；

D——标准管空白荧光值；

f——稀释倍数；

m——样品的质量，g；

m'——标准管中的核黄素的含量，μg；

$\frac{100}{1000}$——将样品中核黄素量由 μg/g 折算成 mg/100g 的折算系数。

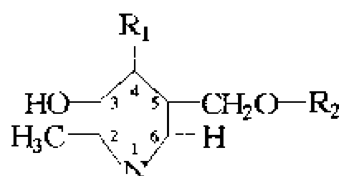
［注意：① 标准曲线由 0.01～20μg 间，呈良好的线形关系，所以每次测定样品的同时，测定与样品含量相近的标准即可。② 氧化去杂质，加入高锰酸钾的量不宜过多，以避免加入双氧水的量大，产生气泡，影响核黄素的吸附及洗脱］



第三节　维生素 B_6 的测定方法

维生素 B_6 是一种含氮的化合物，主要以三种天然形式存在：吡哆醇、吡哆醛及吡哆胺。在溶液中，这三种形式对光都较敏感，所以进行实验时需要避光。

结构式如下：



$PN; R_1 = CH_2OH$　　　　$PNP; R_2 = PO_3^-$

$PM; R_1 = CH_2NH_2$　　　　$PMP; R_2 = PO_3^=$

$PL; R_1 = CHO$　　　　$PLP; R_2 = PO_3^=$

1. 原理

维生素 B_6 在酸性介质中对热都比较稳定，但在碱性介质中对热不稳定。测量维生素 B_6 比较经典的方法是“微生物法”，它的优点是：特异性高、精密度好、操作简单(不需要特殊技巧及设备，易于推广，样品不需要进行一系列的提纯步骤)、准确度高。它的缺点是：耗时长、必须经常保存菌种、试剂较贵。最小检出限：0.1ng。

2. 适用范围

GB/T 17407—1998，适用于药物、食物及饲料的检测。

3. 仪器

(1) 电热恒温培养箱。

(2) 高压釜(121℃，5h)。

(3) 液体快速混合器。

(4) 离心机。

(5) 光栅分光光度计(550nm)。

(6) 硬质玻璃试管。

4. 试剂

所有试剂皆为分析纯，所有水皆为蒸馏水，特殊试剂除外。

(1) 吡哆醇标准溶液

① 吡哆醇标准贮备液：100ug/mL，称取 122mg 盐酸吡哆醇标准溶于 1L 25%乙醇中，保存于 4℃冰箱中，稳定 1 个月。

② 吡哆醇标准中间液：1μg/mL，取 1mL 吡哆醇标准贮备液，稀释至 100mL。[注意：因为溶液对光敏感，需要贮存在棕色瓶中]

(2) 0.22mol/L H_2SO_4，于 2000mL 烧杯中加入 700mL 水，加入 12.32mL

H_2SO_4,用水稀释至1000mL。

(3) 0.5mol/L H_2SO_4,于2000mL烧杯中加入700mL水,加入28mL H_2SO_4,用水稀释至1000mL。

(4) 10mol/L NaOH,溶200g NaOH于水中,稀释至500mL。

(5) 0.1mol/L NaOH,取10mL 10mol/L NaOH,用水稀释至1000mL。

(6) 溴甲酚绿:0.04%溶液,称取0.1g溴甲酚绿于研钵中,加1.4mL 0.1mol/L NaOH研磨,加少许水继续研磨,直至完全溶解,用水稀释到250mL。

(7) 培养基:称取吡哆醇Y培养基5.3g,溶解于100mL蒸馏水中。[注意:选用DIFCO公司的吡哆醇Y,因其不含影响维生素B_6生长的因素,因此选择它作培养基]

(8) 琼脂培养基:吡哆醇Y培养基5.3g,琼脂1.2g,稀释至100mL。

(9) 生理盐水:取9g NaCl溶于1000mL水中。

5. 菌种的制备与保存

(1) 菌种的制备与保存:以卡尔斯伯酵母菌(*Saccharomyces Carlsbergensis* ATCC No.9080简称SC)纯菌种接入2个或多个琼脂培养基管中,在(30±0.5)℃恒温箱中保温18~20h,取出于冰箱中保存,至多不超过两星期。保存数星期以上的菌种,不能立即用作制备接种液之用,一定要在使用前每天移种一次,连续2~3d,方可使用,否则生长不好。

(2) 种子培养液的制备:加0.5mL 50ng/mL的维生素B_6标准应用液于尖头管中,加入5mL基本培养基,塞好棉塞,于高压锅121℃下消毒10min,取出,置于冰箱中,此管可保留数星期之久。每次可制备2~4管。

6. 操作步骤

整个步骤需要避光。

(1) 样品制备:取样0.5~10g(维生素B_6含量不超过10ng)放入100mL三角瓶中,加0.22mol/L H_2SO_4 72mL。放入高压锅121℃下水解5h,取出,于水中冷却,用10mol/L NaOH和0.5mol/L H_2SO_4调pH至4.5,用溴甲酚绿做指示剂。(指示剂由黄-黄绿色),将三角瓶内的溶液转移到100mL容量瓶中,用蒸馏水定容至100mL,滤纸过滤,保存滤液于冰箱内备测(保存期不超过36h)。[注意:加入硫酸以去除蛋白质等影响维生素B_6最后结果的杂质]

(2) 接种液的制备:使用前一天,将卡尔斯伯酵母菌菌种由储备菌种管移种于已消毒的种子培养液中,可同时制备两根管,在(30±0.5)℃的恒温箱中培养18~20h。取出离心10min(3000r/min)倾去上部液体,用已消毒的生理盐水淋洗2次,再加10mL消毒过的生理盐水,将离心管置于液体快速混合器上混合,使菌种成为混悬体,将此液倒入已消毒的注射器内,立即使用。

(3) 样品标准曲线的测定:取标准贮备液2mL稀释至200mL成为中间

液，从中间液中取 5mL 稀释至 100mL 作为工作液，浓度为 50ng/mL，3 组试管各加 0、0.02、0.04、0.08、0.12、0.16mL 工作液，再加 5mL 吡哆醇 Y 培养基，混匀，加棉塞。

（4）试样的测定：在试管中分别加入 0.05、0.10、0.20mL 样液，再加入 5mL 吡哆醇 Y 培养基，用棉塞塞住试管，将制备好的标准曲线和试样测定管放入高压锅 121℃ 下高压 10min，冷至室温备用。

（5）接种和培养：每管种一滴接种液，于（30±0.5）℃ 恒温箱中培养 18～22h。

（6）测定：从恒温箱中取出后，用 722 分光光度计测量，用空白试管调零。550nm 波长下，测定各管的吸光度值，以标准管所含维生素 B_6 的浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制维生素 B_6 标准工作曲线，用测定管得到的吸光度值，在标准曲线上查到测定管内所含维生素 B_6 的量。

7. 计算

每个样品各测定管的吡哆醇含量为 ρ_1、ρ_2、ρ_3；取液量分别为 V_1、V_2、V_3，各样管的吡哆醇含量 ρ 为：

$$\rho(\text{ng/mL}) = (\rho_1/V_1 + \rho_2/V_2 + \rho_3/V_3)/3$$

样品重 m(g) 取液量 V(mL)，定容至 100mL，则样品的吡哆醇含量 ω 为：

$$\omega = \rho \times V \times 10^2/(m \times 10^6) = \rho \times V/(m \times 10^4)(\text{mg/100g})$$

8. 举例

以螺旋藻为例，取螺旋藻 0.56g，高压后定容至 100mL，V_1、V_2、V_3 分别取 0.05、0.1、0.2mL、OD 值为 0.134、0.220、0.355 根据曲线得出 ρ_1、ρ_2、ρ_3 为 0.38、1.00、2.25 所以 $\rho=(0.38/0.05+1.00/0.10+2.25/0.20)/3=9.62$。代入公式 $\omega=\rho\times V/(m\times10^4)=9.62\times100/(0.56\times10000)=0.17$。所以样品的吡哆醇含量为 0.17(mg/100g)

9. 注意事项

（1）所有步骤需要避光处理。

（2）培养时每管必须在同一温度，培养时间以 18～24h 为宜。

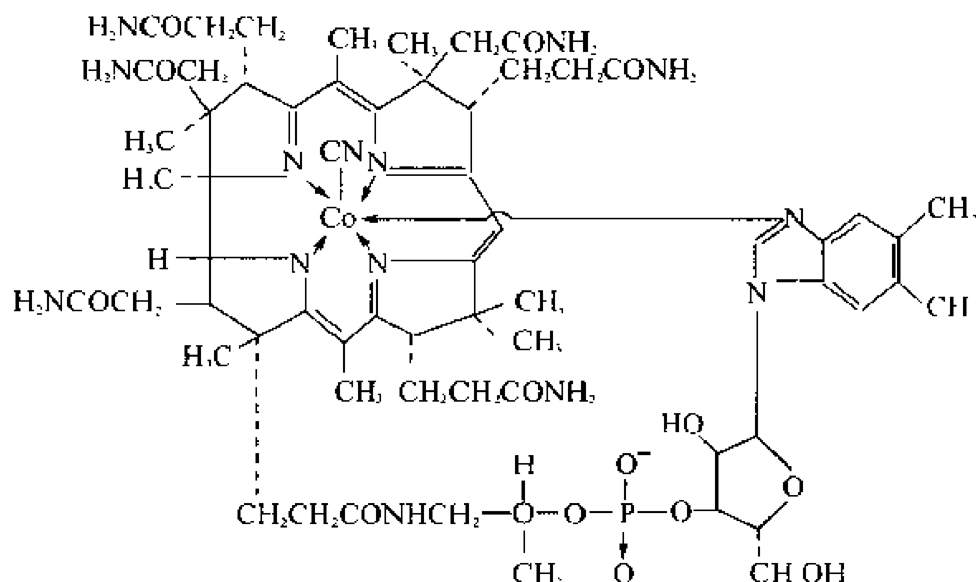
（3）试管应先用洗衣粉清洗后，用水冲净，再放入酸缸中浸泡 1d 左右，捞出后再用自来水和蒸馏水清洗干净，晾干，方可再用。

第四节　食物中维生素 B_{12} 的测定方法（微生物测定法）

维生素 B_{12} 的化学名称为钴胺素（cobalamin），是不含氰基的维生素分子，而一般维生素 B_{12} 的药用形式为氰钴胺（cyanocobalamin），因此氰钴胺成为维生素 B_{12} 的



通俗名称。它是一类含钴的类咕林啉化合物,结构式为:



维生素为红色晶体,可溶于水,在 pH4.5~5.0 的弱酸条件下最稳定,强酸(pH<2)或碱性溶液中则分解。遇热可有一定程度的破坏,但快速高温消毒损失较小。遇强光或紫外线易被破坏。

目前,维生素 B_{12}的测定方法有多种,如薄层色谱法、电位法、高效液相色谱法、分光光度法、放射分析法、微生物法等。其中,放射分析法、高效液相色谱法常用于生物样品(如血清)中维生素 B_{12}的测定。由于维生素 B_{12}在食物中的存在形式多样,且含量较少,给测定带来了许多困难。由于微生物测定法具有灵敏度高、操作简便,适合于各种样品,因此在国际上被广泛地用于食物中维生素 B_{12}的测定。

1. 原理

维生素 B_{12}对于 *Lactobacillus leichmannii*(ATCC 7830)的正常生长是必需的,在一定生长条件下,*Lactobacillus leichmannii* 的生长与繁殖速度和溶液中维生素 B_{12}的含量成一定的线性关系,利用浊度法或光密度法测定细菌生长和繁殖的强度可间接地测定食物样品中维生素 B_{12}的含量。本方法最低检出限 0.001ng。

2. 适用范围

本方法参考"Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists"、"Methods of Vitamin Analysis"以及"Methods of the Microbiological Analysis of Selected Nutrients"。本方法适用于测定食物及饲料中的维生素 B_{12}含量。

3. 试剂

本试验所用水均为蒸馏水,所用试剂均需分析纯试剂。

（1）甲苯。

（2）柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot 3H_2O$)。

（3）磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。

（4）焦亚硫酸钠($Na_2S_2O_5$)。

（5）抗坏血酸(生化试剂)。

（6）无水葡萄糖。

（7）无水乙酸钠。

（8）*L*－胱氨酸(生化试剂)。

（9）*dl*－色氨酸(生化试剂)。

（10）10mol/L NaOH 溶液：称取 200g NaOH 溶于适量水中，定容至500mL。

（11）(1＋4)乙醇溶液：200mL 无水乙醇与 800mL 水充分混匀。

（12）酸解酪蛋白：称取 50g 不含维生素的酪蛋白于 500mL 烧杯中，加200mL 3mol/L 盐酸，121℃高压水解 6h。将水解物转移至蒸发皿内，在沸水浴上蒸发至膏状。加 200mL 水使之溶解后再蒸发至膏状，如此反复 3 次，以去除盐酸。以溴酚蓝作外指示剂，用 10mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 3.5。加 20g 活性炭，振摇，过滤，如果滤液不呈淡黄色或无色，可用活性炭重复处理。滤液加水稀释至 500mL，加少许甲苯于冰箱中保存(该试剂也可从 Difco 公司购得，产品号为 No.0288－15－6)。

[注意：酸解的目的是为了消除酪蛋白中的维生素，确保基本培养基中不含待测定的维生素 B_{12}，但有时酸水解不一定彻底，所以一定要选用不含维生素的酪蛋白粉(Sigma 公司)，这样可较好地确保酸解酪蛋白中不含维生素 B_{12}]

（13）腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液：称取硫酸腺嘌呤(纯度为 98%)、盐酸鸟嘌呤(生化试剂)以及尿嘧啶各 0.1g 于 250mL 烧杯中，加 75mL 水和 2mL 浓盐酸，然后加热使其完全溶解，冷却，若有沉淀产生，加盐酸数滴，再加热，如此反复，直至冷却后无沉淀产生为止，以水稀释至 100mL。加少许甲苯于冰箱中保存。

（14）维生素溶液Ⅰ：称取 25mg 核黄素，25mg 盐酸硫胺素，0.25mg 生物素，50mg 烟酸，用 0.02mol/L 乙酸溶液溶解并定容至 1000mL。

（15）维生素溶液Ⅱ：将 50mg 对氨基苯甲酸，25mg 泛酸钙，100mg 盐酸吡哆醇，100mg 盐酸吡哆醛，20mg 盐酸吡哆胺，5mg 叶酸溶于(1＋4)乙醇溶液，并定容至 1000mL。

（16）甲盐溶液：称取 25g KH_2PO_4、25g K_2HPO_4 溶于 500mL 水中，加 5 滴浓盐酸。

（17）乙盐溶液：称取 10g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.5g NaCl、0.5g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$，

0.5g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶于水并定容至 500mL，加 5 滴浓盐酸。

（18）黄嘌呤溶液：称取 1.0g 黄嘌呤溶于 200mL 水中，70℃ 加热条件下，加入 30mL NH_4OH(2+3) *L*－天冬酰胺溶于水中，并定容至 100mL。

（19）吐温 80 溶液：将 25g 吐温－80 溶于乙醇并定容至 250mL。

（20）维生素 B_{12} 标准溶液（均使用棕色试剂瓶）：

① 维生素 B_{12} 标准贮备溶液（100ng/mL）：称取 50μg（精度 0.01mg 天平）维生素 B_{12} 暗红色针状结晶，用（1+4）的乙醇溶液定容至 500mL，贮存在 2～4℃ 条件下。

② 维生素 B_{12} 标准中间液（1ng/mL）：取 1mL 贮备液用（1+4）的乙醇定容至 100mL。贮存于 2～4℃ 条件下。

③ 维生素 B_{12} 标准使用液（0.02ng/mL）：取 1mL 中间液用水定容至 50mL，用时现配。［注意：维生素 B_{12} 见光易分解，因此在配制标准液时要尽量避光，并且一定要使用棕色试剂瓶］

4. 基本培养基

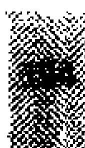
（1）将下列试剂混合于 500mL 烧杯中，加水至 200mL，以溴甲酚紫作外指示剂，用 10mol/L 氢氧化钠液调节 pH 为 6.0～6.1，用水稀释至 250mL。

酸解酪蛋白	25mL
腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液	5mL
天冬胺酰溶液	5mL
吐温－80 溶液	5mL
甲盐溶液	5mL
乙盐溶液	5mL
维生素溶液Ⅰ	5mL
维生素溶液Ⅱ	5mL
黄嘌呤溶液	5mL
抗坏血酸	1.0g
L－胱氨酸	0.1g
dl－色氨酸	0.1g
无水葡萄糖	10.0g
无水乙酸钠	8.3g

该培养基也可从 Difco 公司购得，产品号为 No. 0457－15－1。

［注意：由于国内某些试剂纯度不够，所以自行配制的培养基较浑浊，严重影响到最后的浊度测定结果，因此建议最好使用进口培养基］

（2）琼脂培养基：在 600mL 水中，加入 15g 蛋白胨，5g 水溶性酵母提取物干粉、10g 无水葡萄糖、2g 无水磷酸二氢钾、100mL 番茄汁、10mL 吐温－80 溶



液，每500mL液体培养基加5.0～7.5g琼脂，加热溶解，用10mol/L氢氧化钠调节pH为6.5～6.8，然后定容至1000mL，分装于试管中，于121℃高压灭菌10min，取出后竖直试管，待冷却至室温后于冰箱保存。

（3）生理盐水：称取9.0g氯化钠溶于1000mL水中，每次使用时分别倒入2～4支试管中，每支约加10mL，塞好棉塞，于121℃高压灭菌10min，备用。

（4）0.4g/L溴甲酚紫指示剂：称取0.1g溴甲酚紫于小研钵内，加1.6mL 0.1mol/L氢氧化钠研磨，加少许水继续研磨，直至完全溶解，用水稀释至250mL。

5．仪器与设备

实验室常用设备。

电热恒温培养箱。

压力蒸汽消毒器。

液体快速混合器。

离心机。

硬质玻璃试管：20mm×150mm。

6．菌种与培养液的制备与保存

（1）贮备菌种的制备：*Lactobacillus leichmannii*（ATCC 7830）接种于直面琼脂培养管中，在(37±0.5)℃恒温箱中培养16～24h，取出后放入冰箱中保存。每周至少传种2次以上。在实验前一天必须传种一次。［注意：*Lactobacillus leichmannii*（ATCC 7830）的生命力不强，每周一定要至少传代2～3次，否则极易死亡！］

（2）种子培养液的制备：加2mL 0.02ng/mL维生素B_{12}标准工作液和3mL基本培养基于10mL离心管中，塞好棉塞，于121℃高压灭菌10min，取出冷却后于冰箱中保存。每次制备两管，备用。［注意：加入离心管中的维生素B_{12}标准工作液要适量，过少会阻碍 *Lactobacillus Leichmanni* 的生长，过多会使零管中的光密度值增大，影响测定结果的准确性。一般2～3mL即可］

7．操作步骤

（1）接种液的配制：使用前一天，将已在琼脂管中生长16～24h的*L. leichmannii*接种于种子培养液中，在(37±0.5)℃培养16～24h，取出后离心10min(3000r/min)，弃去上清液，用已灭菌的生理盐水淋洗2次，再加入3mL灭菌生理盐水，混匀后，将此液倒入已灭菌的注射器中，立即使用。

（2）水解液的制备：称取1.3g无水磷酸二氢钠、1.2g柠檬酸及0.1g焦亚硫酸钠($Na_2S_2O_5$)，溶于水中并定容至100mL，用时现配。

（3）称取适量样品，至于100mL三角瓶中，加70mL水解液，混匀，于121℃高压灭菌10min，取出冷却至室温，过滤，然后以溴甲酚紫为外指示剂，用10mol/L NaOH溶液调节pH为6.0～6.1，将水解液移至100mL容量瓶中，定容

至刻度。为保证最后样品测定管中的 $Na_2S_2O_5$ 的浓度≤0.03mg/mL，因此要做适当的稀释。[注意：测定管中 $Na_2S_2O_5$ 的浓度一定要小于0.03mg/mL，过多会抑制 *L. Leichmannii* 的生长，因此在称取样品时要考虑到后来的稀释倍数，避免由于稀释倍数过大造成测定管中的维生素 B_{12} 含量过低，无法检出]

(4) 样品试管的制备：每组平行样品管中分别加入 1.0、2.0、3.0、4.0mL 样品水解液，并用水稀释至 5mL，然后再加入 5mL 基本液体培养基。[注意：实验所用的所有试管必须在烤箱中 180～200℃条件下干热灭菌 2～3h]

(5) 标准系列管的制备：每组试管中分别加入维生素 B_{12}标准工作液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL，使每组试管中维生素 B_{12}的含量为 0.00、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1ng，加水至 5mL，再加入 5mL 基本液体培养基，需做三组标准曲线。

(6) 灭菌：样品管与标准管均用棉塞塞好，于 121℃高压灭菌 10min。[注意：灭菌时间不宜过长，否则会破坏基本培养基中的营养成分，影响 *Lactobacillus Leichmannii* 的生长，最好在 5～10min 内]

(7) 接种与培养：待试管冷至室温后，每管接一滴种子菌液，于(37±0.5)℃恒温箱中培养 16～20h。

[注意：① 接种前，接种室要在紫外灯下消毒至少 30min。② 在接种时，其中一支标准系列 0 管可不接种，这样可观察此次实验是否存在污染，并且可消除由于管中液体的颜色造成的误差]

(8) 测定光密度值：于 640nm 波长条件下，以标准系列中零管调节仪器零点，测定样品管液体及标准管液体的光密度值。[注意：首先以未接种的标准系列 0 管进行仪器调零，然后在用接种后的标准系列 0 管进行 2 次调零，之后再测定其他管中液体的光密度值]

8. 结果计算

以维生素 B_{12}标准系列的不同质量(ng)为横坐标，光密度值为纵坐标，绘制标准曲线。由样品测定管中的光密度值在曲线上查出相对应的样品测定管中的维生素 B_{12}含量，再按以下公式计算样品中维生素 B_{12}含量：

$$x = \frac{m_1 \cdot V \cdot f}{m \times 1000} \times 100$$

式中 x——样品中维生素 B_{12}含量，μg/100g；

m_1——测定管中的维生素 B_{12}含量，ng；

V——样品水解液的定容体积，mL；

f——样品液的稀释倍数；

m——样品质量，g；

100/1000——单位换算系数。

9. 注意事项

(1) 全部实验操作应注意避免日光直接照射。

(2) 在人体肠道中，大肠杆菌可以合成维生素 B_{12}，因此，此实验极易被污

染，在整个实验中，最重要的是注意清洁问题，确保所用的玻璃器皿、操作环境要清洁。

第五节　维生素C(抗坏血酸)的测定方法

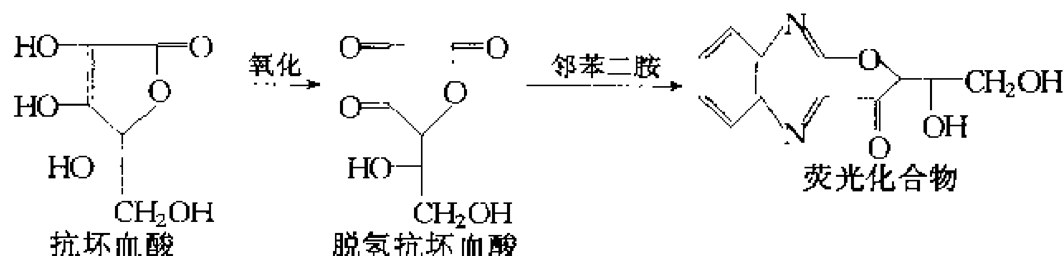
抗坏血酸溶于水，稍溶于丙酮与低级醇类，结晶抗坏血酸稳定，水溶液易氧化，遇空气中氧、热、光、碱性物质，特别是在有氧化酶及痕量铜、铁等重金属离子存在，可促进其氧化破坏进程。酸性、冷藏、隔氧，可延缓食品中抗坏血酸的破坏。

国内外用于食物中维生素C含量测定的主要方法有三种，即2,6－二氯酚靛酚滴定法、2,4－二硝基苯肼法和荧光法。2,6－二氯酚靛酚滴定法只能测定食物中还原型抗坏血酸。由于脱氢型抗坏血酸在人体内与还原型抗坏血酸具有同样的生理功能。在一般情况下，测定食物中总抗坏血酸。2,4－二硝基苯肼法和荧光法都是测定食物中总抗坏血酸含量的方法。2,4－二硝基苯肼法是比色法，易受杂质干扰，灵敏度较低，而荧光法的灵敏度高于比色法2～3个数量级。另外，2,4－二硝基苯肼法采用85%的浓硫酸作溶剂，实验时不易操作。荧光法利用硼酸对脱氢抗坏血酸的掩蔽作用可测出杂质的荧光值，从而提高方法的专一性。因此，荧光法具有灵敏度较高，选择性好，易于操作等优点，但此方法易受仪器条件的限制。所以国标方法中选用荧光法为测定食物中维生素C含量的第一标准方法，而将2,4－二硝基苯肼法作为第二法。

一、荧　光　法

1．原理

样品中还原型抗坏血酸经活性炭氧化成脱氢型抗坏血酸后，与邻苯二胺(OPDA)反应生成具有荧光的喹喔啉(quinoxaline)，其荧光强度与脱氢抗坏血酸的浓度在一定条件下成正比，以此测定食物中抗坏血酸和脱氢抗坏血酸的总量。



脱氢抗坏血酸与硼酸可形成复合物而不与OPDA反应，以此排除样品中荧光杂质所产生的干扰。本方法的最小检出限为0.022g/mL。

2．适用范围

根据GB12392—90进行检测，本方法适用于蔬菜、水果及其制品中总抗坏

血酸的测定。

3. 仪器

(1) 实验室常用设备。

(2) 荧光分光光度计或具有 350nm 及 430nm 波长的荧光计。

(3) 打碎机。

4. 试剂

本实验用水均为蒸馏水，试剂不加说明均为分析纯试剂。

(1) 偏磷酸－乙酸液：称取 15g 偏磷酸，加入 40mL 冰乙酸及 250mL 水，搅拌，放置过夜使之逐渐溶解，加水至 500mL。4℃冰箱可保存 7～10d。

(2) 0.15mol/L H_2SO_4：取 10mL 硫酸，小心加入水中，再加水稀释至 1200mL。

(3) 偏磷酸－乙酸－硫酸液：以 0.15mol/L 硫酸液为稀释液，其余同偏磷酸－乙酸液配制。

(4) 50%乙酸钠溶液：称取 500g 乙酸钠($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)，加水至 1000mL。

(5) 硼酸－乙酸钠溶液：称取 3g 硼酸，溶于 100mL 乙酸钠溶液中。临用前配制。

(6) 邻苯二胺溶液：称取 20mg 邻苯二胺，于临用前用水稀释至 100mL。

(7) 0.04%百里酚蓝指示剂溶液：称取 0.1g 百里酚蓝，加 0.02mol/L 氢氧化钠溶液，在玻璃研钵中研磨至溶解，氢氧化钠的用量约为 10.75mL，磨溶后用水稀释至 250mL。

变色范围：pH＝1.2　　红色

pH＝2.8　　黄色

pH＞4.0　　蓝色

(8) 活性炭的活化：加 200g 炭粉于 1L 1＋9 盐酸中，加热回流 1～2h，过滤，用水洗至滤液中无铁离子为止，置于 110～120℃烘箱中干燥，备用。

(9) 标准液：

① 抗坏血酸标准溶液(1mg/mL)：准确称取 50mg 抗坏血酸，用偏磷酸－乙酸液溶于 50mL 容量瓶中，并稀释至刻度。

② 抗坏血酸标准使用液(100μg/mL)：取 10mL 抗坏血酸标准液，用偏磷酸－乙酸溶液稀释至 100mL。定容前试 pH，如其 pH＞2.2 时，则应用溶液偏磷酸－乙酸－硫酸液稀释。

③ 标准曲线的制备：取下述"标准"溶液(抗坏血酸含量 10μg/mL)0.5、1.0、1.5mL 和 2.0mL 标准系列，取双份分别置于 10mL 带盖试管中，再用水补

充至 2.0mL。

5. 操作步骤

全部实验过程应避光。

(1) 样品制备：称取 100g 鲜样，加 100g 偏磷酸－乙酸溶液，倒入打碎机内打成匀浆，用百里酚蓝指示剂调试匀浆酸碱度。如呈红色，即可用偏磷酸－乙酸溶液稀释，若呈黄色或蓝色，则用偏磷酸－乙酸－硫酸溶液稀释，使其 pH 为 1.2。匀浆的取量需根据样品中抗坏血酸的含量而定。当样品液含量在 40～100μg/mL 之间，一般取 20g 匀浆，用偏磷酸－乙酸溶液稀释至 100mL，过滤，滤液备用。

(2) 氧化处理：分别取样品滤液及标准使用液各 100mL 于带盖三角瓶中，加 2g 活性炭，用力振摇 1min，过滤，弃去最初数毫升滤液，分别收集其余全部滤液，即样品氧化液和标准氧化液，待测定。

(3) 各取 5mL 标准氧化液于 2 个 50mL 容量瓶中，分别标明"标准"及"标准空白"。

(4) 各取 5mL 样品氧化液于 2 个 50mL 容量瓶中，分别标明"样品"及"样品空白"。

(5) 于"标准空白"及"样品空白"溶液中各加 5mL 硼酸－乙酸钠溶液，混合摇动 15min，用水稀释至 50mL，在 4℃ 冰箱中放置 2h，取出备用。

(6) 于"样品"及"标准"溶液中各加入 5mL 50% 乙酸钠溶液，用水稀释至 50mL，备用。

(7) 荧光反应：取"标准空白"溶液，"样品空白"溶液及(6)中"样品"溶液各 2mL，分别置于 10mL 带盖试管中。在暗室中迅速向各管中加入 5mL 邻苯二胺，振摇混合，在室温下反应 35min，用激发光波长 338nm、发射光波长 420nm 测定荧光强度。标准系列荧光强度分别减去标准空白荧光强度为纵坐标，对应的抗坏血酸含量为横坐标，绘制标准曲线或进行相关计算，其直线回归方程供计算时使用。

6. 计算

$$x = \frac{\rho \cdot V}{m} \times f \times \frac{100}{1000}$$

式中　x ——样品中抗坏血酸及脱氢抗坏血酸总含量，mg/100g；

ρ ——由标准曲线查得或由回归方程算得样品溶液浓度，μg/mL；

m ——试样质量，g；

f ——样品溶液的稀释倍数；

V ——荧光反应所用试样体积，mL。



7. 举例

测定每一制备溶液的荧光强度。用标准溶液每1mL含2.5、5.0、7.5μg及10.0μg，各标准浓度管读数减去相应的标准空白读数的各平均值做标准曲线。

由样品液读数减去样品液空白读数之值，从标准曲线上查得相应的抗坏血酸（μg/mL），按取样量及稀释率计算样品中抗坏血酸的含量。

如：取制备好的辣椒样品2.138g，稀释到100mL，氧化后分别取10mL滤液稀释到50mL，样品读数为23.34，样品空白读数为3.188，样品读数减去样品空白读数为20.152，查荧光标准曲线相当标准抗坏血酸的2.23μg。

$$\frac{2.23 \times 100}{2.138} \times \frac{50}{10} \times \frac{100}{1000} = 52(\text{mg}/100\text{g})$$

8. 注意事项

（1）大多数植物组织内含有一种能破坏抗坏血酸的氧化酶，因此，抗坏血酸的测定应采用新鲜样品并尽快用偏磷酸－醋酸提取液将样品制成匀浆以保存维生素C。

（2）某些果胶含量高的样品不易过滤，可采用抽滤的方法，也可先离心，再取上清液过滤。

（3）活性炭可将抗坏血酸氧化为脱氢抗坏血酸，但它也有吸附抗坏血酸的作用，故活性炭用量应适当与准确，所以，应用天平称量。我们的实验结果证明，用2g活性炭能使测定样品中还原型抗坏血酸完全氧化为脱氢型，其吸附影响不明显。

二、2,4－二硝基苯肼法

1. 原理

总抗坏血酸包括还原型、脱氢型和二酮古乐糖酸。样品中还原型抗坏血酸经活性炭氧化为脱氢抗坏血酸，再与2,4－二硝基苯肼作用生成红色脎，脎的含量与总抗坏血酸含量成正比，进行比色测定。

2. 适用范围

根据GB 12392—90进行检测。本方法适用于蔬菜、水果及其制品中总抗坏血酸的测定。

3. 仪器

（1）恒温箱：（37±0.5）℃。

（2）可见－紫外分光光度计。

（3）打碎机。

4. 试剂

本实验用水均为蒸馏水，试剂纯度均为分析纯。

(1) 4.5mol/L H_2SO_4：谨慎地加250mL硫酸(相对密度1.84)于700mL水中，冷却后用水稀释至1000mL。

(2) 85%H_2SO_4：谨慎地加900mL硫酸(相对密度1.84)于100mL水中。

(3) 2% 2,4-二硝基苯肼溶液：溶解2g 2,4-二硝基苯肼于100mL 4.5mol/L H_2SO_4内，过滤。不用时存于冰箱内，每次用前必须过滤。

(4) 2% $H_2C_2O_4$溶液：溶解20g草酸于700mL水中，稀释至1000mL。

(5) 1% $H_2C_2O_4$溶液：稀释500mL 2%草酸溶液到1000mL。

(6) 1%硫脲溶液：溶解5g硫脲于500mL 1%草酸溶液中。

(7) 2%硫脲溶液：溶解10g硫脲于500mL 1%草酸溶液中。

(8) 1mol/L盐酸：取100mL盐酸，加入水中，并稀释至1200mL。

(9) 活性炭：将100g活性炭加到750mL 1mol/L盐酸中，回流1～2h，过滤，用水洗数次，至滤液中无铁离子(Fe^{3+})为止，然后置于110℃烘箱中烘干。

(10) 标准液：

① 抗坏血酸标准溶液(1mg/mL)：溶解100mg纯抗坏血酸于100mL 1%草酸溶液中。

② 标准曲线绘制：加1g活性炭于50mL标准溶液中，摇动1min，过滤。取10mL滤液放入500mL容量瓶中，加5.0g硫脲，用1%草酸溶液稀释至刻度。抗坏血酸浓度为20μg/mL。取5、10、20、25、40、50、60mL稀释液，分别放入7个100mL容量瓶中，用1%硫脲溶液稀释至刻度，使最后稀释液中抗坏血酸的浓度分别为1、2、4、5、8、10、12μg/mL。

按样品测定步骤形成脎并比色。

以吸光值为纵坐标，以抗坏血酸浓度(μg/mL)为横坐标绘制标准曲线。

5. 操作步骤

全部实验过程应避光。

(1) 样品制备：

① 鲜样制备：称100g鲜样和100g 2%草酸溶液，倒入打碎机中打成匀浆，取10～40g匀浆(含1～2mg抗坏血酸)倒入100mL容量瓶中，用1%草酸溶液稀释至刻度，混匀。

② 干样制备：称1～4g干样(含1～2mg抗坏血酸)放入乳钵内，加入1%草酸溶液磨成匀浆，倒入100mL容量瓶中，用1%草酸溶液稀释至刻度，混匀。



③ 将上述两液过滤，滤液备用。不易过滤的样品可用离心机沉淀后，倾出上清液，过滤，备用。

（2）氧化处理：取 25mL 上述滤液，加入 0.5g 活性炭，振摇 1min，过滤，弃去最初数毫升滤液。取 10mL 此氧化提取液，加入 10mL 2%硫脲溶液，混匀。

（3）呈色反应：

① 于 3 个试管中各加入 4mL 稀释液。一个试管作为空白，在其余试管中加入 1.0mL 2%2,4－二硝基苯肼溶液，将所有试管放入(37±0.5)℃恒温箱或水浴中，保温 3h。

② 3h 后取出，除空白管外，将所有试管放入冰水中。空白管取出后使其冷到室温，然后加入 1.0mL 2% 2,4－二硝基苯肼溶液，在室温中放置 10～15min 后放入冰水内。其余步骤同样品。

③ 85%硫酸处理：当试管放入冰水后，向每一试管中加入 5mL 85%硫酸，滴加时间至少需要 1min，需边加边摇动试管。将试管自冰水中取出，在室温放置 30min 后比色。

④ 比色：用 1cm 比色杯，以空白液调零点，于 500nm 波长测吸光值。

6. 计算

同荧光法。

7. 注意事项

（1）大多数植物组织内含有一种能破坏抗坏血酸的氧化酶，因此，抗坏血酸的测定应采用新鲜样品并尽快用 2%草酸溶液制成匀浆以保存维生素 C。

（2）若溶液中含有糖，硫酸加得太快，溶解热会使溶液变黑。

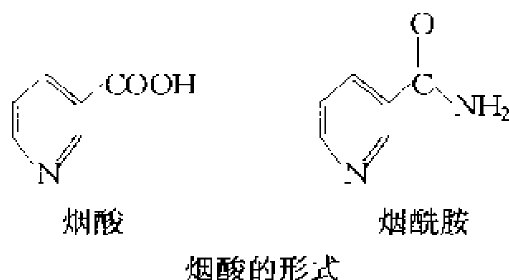
（3）试管自冰水中取出后，颜色会继续变深，所以，加入硫酸后 30min 应准时比色。

第六节　维生素 PP(烟酸)的测定方法

烟酸广泛存在于食物中。它的检测方法有多种，例如：微生物法、比色法和分光光度法。其中微生物法特异性高、精密度好、操作简单、准确度高、灵敏度高，但是耗时长、必须常年保存菌种、使用的试剂较贵、操作步骤多、检测范围窄。而比色法所用时间短、操作简单，但是此种方法所用试剂毒性大、处理样品较复杂。分光光度法的优点是：所用时间短、操作简单、所用的试剂少。缺点是：试剂毒性大、时间限制严格且对样品有很严格的限制。

烟酸的结构式如下：





烟酸的形式

一、微 生 物 法

1. 原理

一种微生物生长必需某一些维生素，*Lactobacillus arabinosus* 的生长需要烟酸。烟酸是指具有烟酸生物学活性的吡啶　3　羧酸及其衍生物的总称。它是白色晶体，是维生素中最稳定的一种，对酸、碱、热、光及弱氧化剂都很稳定，微溶于冷水，易溶于热水及乙醇。其检出限为 10ng。

2. 适用范围

本方法来源自 AOAC 和国标 GB 12395—90。适用于食物及饲料中的烟酸的检测。

3. 仪器

(1) 电热恒温培养箱(37±0.5)℃。

(2) 无菌室(紫外灯消毒)。

(3) 电热手提式压力蒸汽消毒器(121℃，高压 30min)。

(4) 液体快速混合器。

(5) 离心机(3000r/min，10min)。

(6) 碱式滴定管。

(7) 硬质玻璃试管。

4. 试剂

所用试剂皆为分析纯，所用水皆为蒸馏水。

(1) 标准溶液的配制：

① 烟酸标准贮备液(0.1mg/mL)：准确称取 50.0mg 已干燥恒重并贮于五氧化二磷干燥器中的烟酸标准，以 25% 乙醇溶液溶解并定容至 500mL，于冰箱中保存。

② 烟酸标准中间液(1μg/mL)：吸取 1.00mL 烟酸标准贮备液，置于 100mL 容量瓶中，用 25% 乙醇溶液定容，混匀，于冰箱中保存。

③ 烟酸标准工作液(0.1μg/mL)：临用时吸取 5.00mL 烟酸标准中间液，置于 50mL 容量瓶中，用水定容，混匀。

(2) 其他试剂的配制：

① 0.5mol/L H_2SO_4：于 2000mL 烧杯中加入 700mL 水，加入 28mL H_2SO_4，用水稀释至 1000mL。

② 10mol/L NaOH：溶 200g NaOH 于水中，稀释至 500mL。

③ 0.1mol/L NaOH：取 10mL 10mol/L NaOH，用水稀释至 1000mL。

④ 0.04%溴甲酚绿溶液：称取 0.1g 溴甲酚绿于研钵中，加 1.4mL 0.1mol/L NaOH研磨，加少许水继续研磨，直至完全溶解，用水稀释到 250mL。

⑤ 酪蛋白(Sigma 公司)：称取 50g 不含维生素的酪蛋白，加 200mL 3mol/L HCl，121℃下水解 6h，将水解物转移至蒸发皿内，在水浴上蒸发至膏状。加 200mL 水使之溶解后再蒸发至膏状，反复 3 次，以除去盐酸[注意：① 酸解酪蛋白是为了去除酪蛋白中的维生素，确保培养基中不含代测的烟酸，但酸解并不一定彻底，因此选用不含维生素的酪蛋白。② 水浴蒸发时不可蒸干或使之焦糊，若溶液被蒸干，水解液所含营养物已被破坏]。

用 10mol/L NaOH 调节 pH 至 3.5，以溴酚蓝作外指示剂。加 20g 活性炭，振摇，过滤，反复操作至滤液无色。滤液加水稀释至 500mL，加少许甲苯置冰箱中保存[注意：活性炭不能在溶液中太久，否则容易破坏酪蛋白的营养成分]。

⑥ 溴酚蓝：称取 0.1g 溴酚蓝，用 1+4 乙醇溶解后，再加乙醇稀释至 100mL。

⑦甲苯。

⑧ 2.4mol/L HCl 溶液，$V+V=1+4$。

⑨ 1.5mol/L 生理盐水：取 9g NaCl 溶于 1000mL 水中。

⑩ 胱氨酸、色氨酸溶液：称取 4g L－胱氨酸和 1g L－色氨酸溶于 800mL 水中，加热至 70～80℃，逐滴加入 20%盐酸，不断搅拌，直至完全溶解为止。冷至室温，加水稀释至 1000mL。加少许甲苯于冰箱中保存。

⑪ 腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液：称取硫酸腺嘌呤、盐酸鸟嘌呤及尿嘧啶各 0.1g，加 75mL 水和 2mL 浓盐酸，然后加热使其完全溶解，冷却，若有沉淀产生，加浓盐酸数滴，再加热。如此反复，直至冷却后无沉淀产生为止。用水稀释至 100mL。加少许甲苯于冰箱中保存。

⑫ D－泛酸钙、对氨基苯甲酸、盐酸吡哆醇溶液：称取 D－泛酸钙、对氨基苯甲酸、盐酸吡哆醇各 10mg 于烧杯中，以水溶解并稀释至 1000mL，将此液置于棕色瓶中，加少许甲苯于冰箱中保存[注意：此溶液见光分解，因此储存于棕色瓶中]。

⑬ 0.02mol/L CH_3COOH 溶液：取 1.18mL 纯的冰醋酸，稀释至 1000mL。

⑭ 核黄素、盐酸硫胺素、生物素溶液：溶解 1mg 生物素结晶于 100mL 0.01747mol/L 的 CH_3COOH 中，取此液 4mL(相当于 40μg 生物素)，加入 20mg 核黄素和 10mg 盐酸硫胺素，以0.01747mol/L醋酸溶解并稀释至 1000mL，将此液置于棕色瓶中，加少许甲苯于冰箱中保存[注意：此溶液见光分解，因此贮存于棕色瓶中]。

⑮ 甲盐溶液：取 25g 磷酸氢二钾和 25g 磷酸二氢钾，加水溶解后稀释至



500mL,加少许甲苯于冰箱中保存。

⑯ 乙盐溶液：取 10g 硫酸镁、0.5g 氯化钠、0.5g 硫酸亚铁和 0.5g 硫酸锰，加水溶解后稀释至 500mL,加 5 滴浓盐酸,加少许甲苯于冰箱中保存。

⑰ 乙醇溶液 $V/V=1/3$。

⑱ 溴酚蓝：称取 0.1g 溴酚蓝,用 1+3 乙醇溶液溶解后,再稀释至 100mL。

⑲ 0.04%溴麝香草酚蓝溶液：称取 0.1g 溴麝香草酚蓝于研钵中,加 1.6mL, 0.1mol/L NaOH,研磨,加少许水继续研磨,直至完全溶解,用水稀释至 250mL。

⑳ 0.004%溴麝香草酚蓝溶液：量取 100mL 0.04%溴麝香草酚蓝溶液,加水稀释至 1000mL,供滴定用。

㉑ 基本培养基贮备液：

酸解酪蛋白	50mL
胱氨酸、色氨酸溶液	50mL
腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液	10mL
D-泛酸钙、对氨基苯甲酸、吡哆醇溶液	10mL
核黄素、盐酸硫胺素、生物素溶液	10mL
甲盐溶液	10mL
乙盐溶液	10mL
无水葡萄糖	10g
无水醋酸钠	10g
(或结晶醋酸钠 $NaAC \cdot 3H_2O$	16.6g)

将上列试剂混合,用水稀释至 500mL 用氢氧化钠调 pH 至 6.8,以溴麝香草酚蓝作外指示剂。

㉒ 琼脂培养基：

无水葡萄糖	1g
醋酸钠	1g
蛋白胨	0.8g
酵母提取物干粉	0.2g
甲盐溶液	0.2mL
乙盐溶液	0.2mL
琼脂	1.2g

混合,加水至 100mL,加热至琼脂完全溶化,以溴麝香草酚蓝为外指示剂,用盐酸趁热调 pH 至 6.8,尽快倒入试管中,每管 3~5mL,加塞棉塞,于压力蒸汽消毒器中 121℃ 灭菌 10min,取出后竖直试管,冷至室温后保存于冰箱中。

(3) 菌种的制备与保存：

① 菌种的制备与保存：以阿拉伯乳酸杆菌（*Lactobacillus arabinosus* 17－5 ATCC No.8014 简称 *Lact*.A）纯菌种接入2个或多个琼脂培养基管中，在(37±0.5)℃恒温箱中保温16～24h，取出于冰箱中保存，至多不超过2周。保存数周以上的菌种，不能立即用作制备接种液之用，一定要在使用前每天转种一次，连续2～3d，方可使用，否则生长不好。

② 种子培养液的制备：加5mL 0.1μg/mL的烟酸标准应用液于尖头试管中，加入5mL基本培养基，塞好棉塞，于压力蒸汽消毒器内（高压锅）121℃下消毒10min，取出，置于冰箱中，此管可保存数周之久。

5. 操作步骤

(1) 样品制备：取含烟酸约5～50μg的均匀样品于100mL三角瓶中，加0.5mol/L H_2SO_4 50mL。放入高压蒸汽锅121℃下水解30min，取出，于水中冷却，用10mol/L NaOH和0.5mol/L H_2SO_4 调pH至4.5，用溴甲酚绿做指示剂。将三角瓶内的溶液转移到100mL容量瓶中，用蒸馏水定容至100mL，滤纸过滤，保存滤液于冰箱内备测（保存期不超过36h）[注意：用0.5mol/L硫酸水解，可以断开烟酸和其他物质结合的键，使烟酸游离出来。观察溴甲酚绿至草绿色为终点，说明溶液pH到了4.5。调pH至4.5可以除去样品中刺激和抑制细菌生长的物质，如：淀粉、脂肪酸及磷脂。许多蛋白质的等电点也在pH4.5，所以此pH也可用来沉淀蛋白质]。

(2) 接种液的制备：使用前一天，将阿拉伯乳酸杆菌菌种由贮备菌种管移种于已消毒的种子培养液中，可同时制备两管，在(37±0.5)℃的恒温箱中培养16～24h。取出离心10min(3000r/min)倾去上部液体，用已消毒的生理盐水淋洗2次，再加10mL消毒过的生理盐水，将离心管置于液体快速混合器上混合，使菌种成为混悬体，将此液倒入已消毒的注射器内，立即使用。

(3) 样品标准曲线的测定：3组试管各加0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL和3.0mL工作液，每管加水稀释至5mL，再加5mL基本培养基，混匀，加棉塞。

(4) 试样的测定：在试管中分别加入1、2、3、4mL样液，加水稀释至5mL，再加入5mL基本培养基，用棉塞塞住试管，将制备好的标准曲线和试样测定管放入高压锅(121℃)高压10min，冷至室温备用。

(5) 接种和培养：每管种一滴接种液，于(37±0.5)℃恒温箱中培养72h[注：接种后用振荡器振荡混匀试管中的液体]。

(6) 滴定：从恒温箱中取出后，将试管中培养液倒入50mL三角瓶中，用5mL 0.004%溴麝香草酚蓝分2次淋洗试管，洗液倒入该三角瓶中，以0.1mol/L NaOH溶液滴定，呈绿色即为终点，此时pH约6.8，绘制烟酸标准工作曲线，用测定管得到的值，在标准曲线上查到测定管内所含烟酸的量[注意：水解液的pH调至6.8是为了不同的试剂加入基本培养基时，不致改变基本培养基的pH。此乳酸菌生长的适宜pH为6.8]。

6. 计算

以烟酸标准系列的不同质量(μg)为横坐标,滴定所需 0.1mol/L NaOH 的体积(mL)为纵坐标,作为标准曲线。

$$x = (\rho \times V/m) \times f \times (100/1000)$$

式中　x ——样品中烟酸的含量,mg/100g;

ρ ——每毫升样品中烟酸含量的平均值,μg/mL;

V ——样品水解液定容总体积,mL;

f ——样品试液的稀释倍数;

m ——试样质量,g;

100/1000 ——折算成每 100g 样品中烟酸含量,mg。

7. 举例

取一螺旋藻样品 1.004g(m),处理后定容为 100mL(V),从中取 1mL 稀释至 25mL(f),取 1、2、3、4mL 入试管中,加入水和培养基,高压消毒,培养,滴定,测量根据曲线分别得出 4 管 C 值为 0.037、0.073、0.110、0.136,所以 4 管平均值为 $\rho = (0.037 + 0.073/2 + 0.110/3 + 0.136/4)/4 = 0.036$。代入方程式为:

$$x = (\rho \times V/m) \times f \times (100/1000) = (0.036 \times 100/1.004) \times 25 \times (100/1000) = 8.96(\text{mg}/100\text{g})$$

因此得出每 100g 螺旋藻中含 8.96mg 烟酸。

8. 注意事项

(1) 当管中烟酸的量少于 0.05μg 或多于 0.3μg,即超过标准曲线范围时所得到的数值不能用于计算。

(2) 3mol/L 盐酸的配制方法:取 250mL 浓盐酸,加入 750mL 蒸馏水,共配成 1L 3mol/L 的盐酸。

(3) 试管应先用洗衣粉清洗后,用水冲净,再放入酸缸中浸泡 1d 左右,捞出后再用自来水和蒸馏水清洗干净,晾干,方可再用。

二、比　色　法

1. 原理

烟酸和烟酰胺于 pH=4.5 下用稀 NH_4OH 提取,再与 CNBr 溶液与 10% 对氨基苯磺酸反应,测其比色值。

2. 适用范围

选自 AOAC;适用范围:适用于药物、食物和饲料。

3. 仪器设备

(1) 容量瓶,100mL。

（2）锥形瓶，250mL。

（3）电热板。

（4）高压釜（121℃，30min）。

（5）离心管，5mL。

（6）漏斗。

（7）通风橱。

（8）酸式滴定管。

比色计（药物 430～450nm，谷物 470nm）。

4．试剂

所用试剂皆为分析纯，所用水皆为蒸馏水。

（1）烟酸标准溶液：

① 烟酸标准贮备液（100μg/mL）：将 50mg USP 烟道参比标准（贮于 P_2O_5 干燥器中，放于暗处保存）。

② 标准中间液 I（10μg/mL）：取少量贮备液放置至室温。用蒸馏水将 10.0mL贮备液稀释至 100mL。

③ 标准工作液 II（4μg/mL）：将恢复至室温的贮备液 2.0mL 用蒸馏水稀释至 50mL。

（2）稀氢氧化铵溶液：5mL NH_4OH 用 H_2O 稀释至 250mL。

（3）稀盐酸：$V+V=1+5$。

（4）磷酸盐缓冲液（pH=8）：将 60g$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 和 10g KH_2PO_4 溶于蒸馏水中并稀释至 200mL。

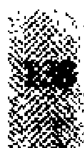
（5）溴化氰溶液（10%，通风橱中制备）：将 370mL H_2O 温热至 40℃，并加入 40g CNBr。振荡至溶解冷却并稀释至 400mL。溶液在冰箱保存［注意：CNBr 剧毒，切勿与皮肤接触，必须在通风橱中操作］。

（6）10%对氨基苯磺酸溶液：按每次 1mL 将 NH_4OH 加到 20g 对氨基苯磺酸和 170mL 蒸馏水的混合液中，直至酸溶解为止。用盐酸与蒸馏水溶液（1∶1）调节 pH 至 4.5，采用溴甲酚绿指示剂指示。稀释至 200mL［注意：因为溶液有颜色会影响最后结果，所以稀释结束后溶液应几乎无色］。

（7）55%对氨基苯磺酸溶液：在 55g 对氨基苯磺酸中加入 27mL 蒸馏水和 27mL NH_4OH，振摇至溶解［注意：必要时加温］。用 NH_4OH 或 5NHCl 调 pH 为 7，再用蒸馏水稀释至 100mL［注意：保存在暗处］。

（8）0.5mol/L H_2SO_4：于 2000mL 烧杯中加入 700mL 水，加入 28mL H_2SO_4，用水稀释至 1000mL。

（9）10mol/L NaOH：溶 200g NaOH 于水中，稀释至 500mL。



（10）盐酸。

（11）硫酸铵。

（12）氢氧化钙。

（13）对氨基苯磺酸。

5. 操作步骤

（1）样品制备：

① 药物：将药品研碎，溶于蒸馏水中，稀释定容。取10mL样品于锥形瓶中，加入10mLHCl，在电热板上加热蒸发至约2mL，冷却，加入25～50mL蒸馏水，用10mol/L NaOH或KOH溶液调节pH至2.5～4.5。过滤，弃去10mL处液，转移至容量瓶中定容，使溶液含烟酸约4μg/mL[注意：溶液的烟酸含量应在50～200μg/mL]。

② 非谷类食品及饲料：称取约28g样品，加入0.5mol/L H_2SO_4 200mL，混匀，在高压釜中121℃加热0.5h。冷却，用10mol/L NaOH调节pH至4.5，以溴甲酚绿作外指示剂，用蒸馏水稀释至250mL，过滤。取17g$(NH_4)_2SO_4$于50mL容量瓶中，吸取40mL样品液，用H_2O稀释定容，强力振摇。过滤，混匀，取1mL作比色测定用。如果样品中烟酸含量为16mg/1b(1b＝0.45kg)。最终液浓度3.2μg/mL。

移取40mL标准工作液Ⅱ至盛有17g$(NH_4)_2SO_4$的50mL容量瓶中，用蒸馏水稀释定容，此液含烟酸3.2μg/mL[注意：加入H_2SO_4主要是为了去除样品中的蛋白及其他杂质，以防其对测量结果造成影响]。

③ 谷类产品：随同样品做1试剂空白和5个浓度的工作标准液。

分别将1.5g $Ca(OH)_2$放入7个锥形瓶中，移入0、5、10、15、20、25mL标准中间液Ⅰ和2.5g样品(含100μg烟酸)，加入蒸馏水至90mL，振摇混匀。高压121℃下2h。趁热混匀，冷却至40℃，转移至100mL容量瓶中，稀释定容。

从容量瓶移50mL上清液至离心管中，冰浴15min或置于冰箱中≥2h。离心15min，吸取20mL上清液至盛有8g$(NH_4)_2SO_4$和2mL磷酸盐缓冲液的离心管中。振荡溶解并温热至55～60℃。离心5min，过滤。

（2）操作程序：

① 药物制剂和非谷类食物和饲料：假如10%的对氨基苯磺酸溶液，CNBr溶液，在通风橱中用酸式滴定管滴入，用标准工作液Ⅱ，如下表制备各管：

试　　剂	标准空白/mL	样品空白/mL
标准溶液	1.0	1.0
H_2O	5.0	5.0
稀 NH_4OH	0.5	0.5
10%对氨基苯磺酸	2.0	2.0
稀 HCl	0.5	0.5

续表

试　剂	标准空白/mL	样品空白/mL
样品溶液		
标准溶液	1.0	1.0
稀 NH_4OH	0.5	0.5
CNBr	5.0	5.0
10%对氨基苯磺酸	2.0	2.0
H_2O	0.5	0.5

注：CNBr 有毒，注意通风。

每只样品都要分别制备样品空白。

将标准和样品移入试管中，分别加入 5mL 蒸馏水作为标准空白和样品空白。转动试管内的液体，立即加入稀 NH_4OH，转动，加对氨基苯磺酸，再次旋转混合。立即加入 0.5mL 稀 HCl，混匀，置于光电比色计上，加入对氨基苯磺酸后约 30s 内在 430nm 和 450nm 波长之间任意波长调节仪器至 0 的 *A* 值（*A* 是吸光度值）。从加入稀 NH_4OH 开始按标准空白同样的方法处理标准溶液。立即转动管子，加 CNBr 溶液并再次转动混匀，在加入 CNBr 溶液后 30s 后转动管子，加入对氨基苯磺酸溶液，再转动。立即加入 0.5mL 蒸馏水，混匀，加塞。测量[注意：加入对氨基苯磺酸溶液后 1.5min 时颜色最深，保留 2min，然后慢慢退色]。

将样品空白设在 0，测样品溶液的 *A* 值。若标准和样品液含量大致相等，则烟酸含量与 *A* 值成正比。

② 谷类制品：取 5 只试管，其中两只加入 5mL 标准液，两只加入 5mL 样品液，另一只加入 5mL 蒸馏水做试剂空白。于一只空白管，一只标准管和一只样品管各加 10mL 蒸馏水，将所有管置于冰中冰浴 30min。对剩下的管按顺序加入 10mL 冷的 CNBr，30s 后加入 1.0mL 55%对氨基苯磺酸溶液。

用标准空白在 470nm 处，调比色计为 0，加入对氨基苯磺酸后 12～15min 读出其他各管的 *A* 值[注意：放入比色计前，试管必须冷却一致，每管必须拭干。如管呈雾状，浸于热水中片刻，测定前拭干]。

6．计算

将扣除试剂空白的标准 *A* 对烟酸含量 μg/mL 做图，画出适宜的直线，从此图上求出已扣除样品空白和试剂空白后样品校正的 *A* 所对应的浓度 *c*。

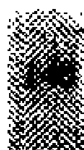
烟酸(mg)/样品(g) = c/10ng 样品

7．注意事项

(1) CNBr 溶液有毒，要注意安全。

(2) 样品不同，处理方法不同，不要混淆。

(3) 注意通风橱的通风。



（4）因为采用比色法测量，因此样品含有色素易干扰测定，影响测定结果的正确性。

（5）试管应先用洗衣粉清洗后，用水冲净，再放入酸缸中浸泡 1d 左右，捞出后再用自来水和蒸馏水清洗干净，晾干，方可再用。

三、复合维生素制剂中的烟酰胺测定——分光光度法

1．原理

在 pH 约 4.5 处将烟酰胺抽提到 KH_2PO_4 溶液中，再与 CNBr 和巴比士酸反应。用分光光度法测定反应产物。烟酸含量超过烟酰胺 3 倍量时干扰烟酰胺测定。

2．适用范围

选自 AOAC，适用复合维生素制剂检测。

3．仪器

（1）搅拌器。

（2）量筒。

（3）锥形瓶。

（4）高压釜（121℃，15min）。

分光光度计（550nm）。

4．试剂

所用试剂皆为分析纯；所用水皆为蒸馏水。

（1）烟酰胺标准溶液：

① 标准贮备液（250μg/mL）：50mg USP 烟酰胺标准加 60％乙醇溶解并稀释到 200mL。在 10℃贮存。

② 标准工作液（5μg/mL）：将少量贮备液温热至室温。取出 2mL 用 0.3％ KH_2PO_4 溶液稀释至 100mL。

（2）溴化氰溶液：10％，将 370mL H_2O 温热至 40℃，并加入 40g CNBr。振荡至溶解冷却并稀释至 400mL。溶液在冰箱保存。使用前需恢复到室温［注意：CNBr 剧毒，切勿与皮肤接触，注意在通风橱中操作］。

（3）磷酸二氢钾溶液：

① 13％的磷酸二氢钾溶液：将 30g KH_2PO_4 用蒸馏水溶解并稀释到 1L。

② 0.3％的磷酸二氢钾溶液：将 3％的磷酸二氢钾溶液用蒸馏水稀释（1＋9）。

（4）巴比士酸缓冲液：按每批测定需用量计算，按每 100mL3％ KH_2PO_4 溶液加 2g 试剂级巴比士酸制备。搅拌 1h，用前过滤。

5．操作步骤

（1）样品制备：取适量样品于锥形瓶中，加入 0.3％的 KH_2PO_4（KH_2PO_4

的量至少是估计的烟酰胺量的2倍)。若样品不易溶解,则振摇使其分散并用高压釜在121℃下加热15min。用0.3% KH_2PO_4 溶液稀释至5μg/mL,过滤。

(2) 用蒸馏水代替CNBr分别制备各样品的空白。将1mL工作标准液或测定液置于分光光度计比色管中。加0.5mL CNBr溶液,混匀,塞住,放置25~30min,加10mL巴比土酸溶液并旋摇[注意:若30min后不能加巴比土酸溶液。将管置于碎冰浴中稳定CNBr反应]。

用蒸馏水代替CNBr作为适当的空白,(550nm,分光光度计设定在OA)颜色最深时测定反应产物的吸光度[注意:① 加入巴比士酸后2~4min时颜色最深,稳定约1min,慢慢退去。② 测定样品时,其放置时间不应超过30min。加入CNBr时应有规律的间隔1~2min]。

6. 计算

样品中烟酰胺含量=(A×5×稀释倍数)/(A'×1000)(mg)

式中 A——样品吸光度;

A'——标准吸光度;

5——μg烟酰胺/mL标准工作液。

[注意:一般此方法主要用于药片的检测,所以用烟酰胺mg/片报告]

7. 注意事项

(1) CNBr有毒,应在通风橱中操作。

(2) 样品中烟酸含量超过烟酰胺含量的3倍量时会干扰烟酰胺的测定,因此样品应有明确的烟酸和烟酰胺的含量。

(3) 试管应先用洗衣粉清洗后,用水冲净,再放入酸缸中浸泡1d左右,捞出后再用自来水和蒸馏水清洗干净,晾干,方可再用。

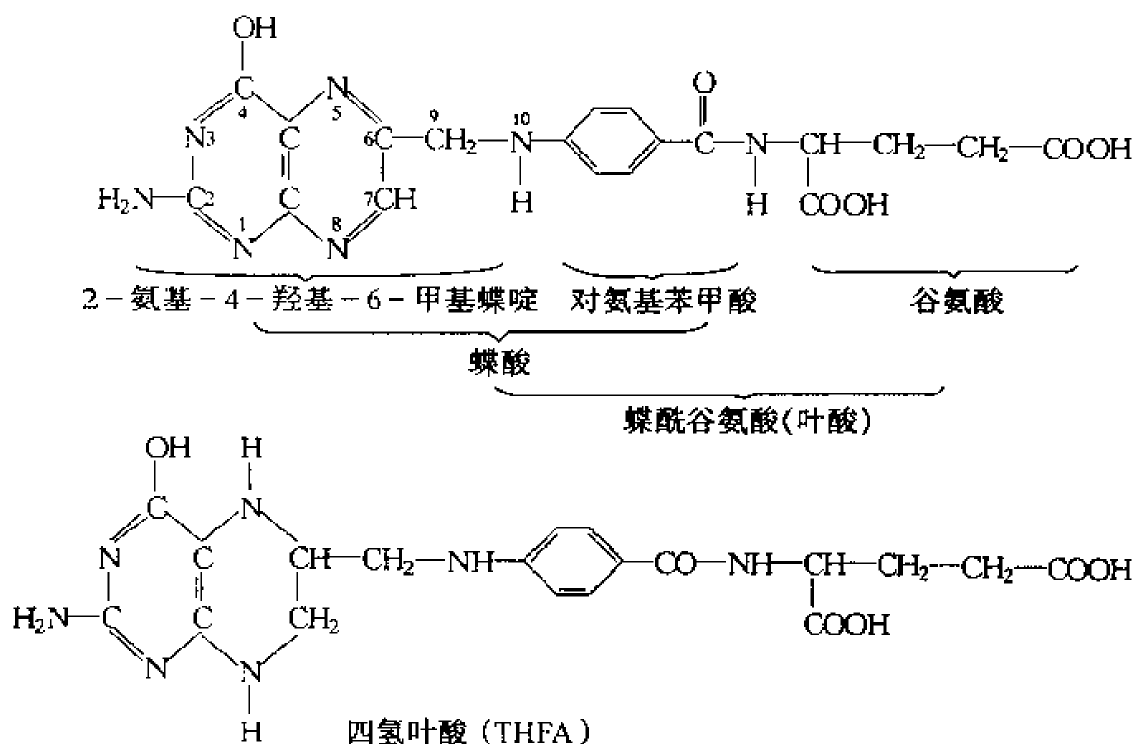
第七节 叶酸的测定方法(微生物测定法)

叶酸是一种重要的B族维生素,其结构是由一个蝶啶与一个对氨基苯甲酸结合成蝶酸,再与一个或多个谷氨酸结合而成,其化学名称为蝶酰谷氨酸(pteroylglutamate, pteGlu)。通常意义上,叶酸指的是一组具有蝶酰谷氨酸结构和相关生物活性的同效维生素。它的英文名称包括folic acid, folate, folates, folacin,一般可以互用。

叶酸外观为淡黄色结晶粉末,微溶于水,其钠盐易于溶解。不溶于乙醇、乙醚等有机溶剂。叶酸对热、光敏感,在酸性条件下不稳定,在碱性和中性溶液中对热敏感。

叶酸的测定方法主要有微生物法、HPLC法、荧光法和放射免疫法等。后几种方法因快速等优点受到青睐,尤其是HPLC法近年来发展迅速。但是由于叶

酸衍生物繁多,标准品来源有限——各种衍生物需从不同化学公司或实验室购买,有的甚至需要自行合成;食品中存在多种干扰因素等问题,使分析方法的使用受到限制。微生物法是测定叶酸的经典方法,目前美、英、日等国家仍采用此法用于测定食物成分中叶酸含量。微生物法所选用的菌种可利用培养基中叶酸单谷氨酸或双谷氨酸盐进行生长,灵敏度较高,但是检测需要的时间较长。天然食物中大部分叶酸为多谷氨酸盐,所以在测定之前,需用轭合酶(conjugase)对叶酸进行水解。叶酸的结构式如下所列:



1. 原理

叶酸是酪乳酸杆菌(*Lactobacillus casei*, *L. C*, ATCC 7469 简称 *L. C*)生长所必需的营养素。在一定条件下,*L. C* 的生长繁殖与培养基中叶酸含量呈正比关系,细菌增殖的量以光密度值计,通过与标准曲线相比较,计算出样品中叶酸的含量。

2. 适用范围

参考 *Methods of Vitamin Assay*,第四版。本方法适用于各类食物中叶酸的测定。检测限为 0.1ng。

3. 仪器与设备

(1) 恒温培养箱。

(2) 离心机。

(3) 高压消毒锅。

(4) 振荡器。

(5) 接种针和接种环。

(6) 分光光度计。

4．试剂

除特殊说明外，本实验中所有试剂均为分析纯，水为蒸馏水。

(1) 菌种：酪乳酸杆菌(*Lactobacillus casei*，*L*.*C*，ATCC 7469)。

(2) 磷酸缓冲液(0.05mol/L，pH6.8)：称取4.35g $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$，10.39g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 溶解于800mL水中。临用前用约5g抗坏血酸调节pH至6.8[注意：叶酸对光、热敏感，易被氧化破坏，抗坏血酸有助于保护叶酸被氧化]。

(3) 鸡胰酶溶液：称取100mg干燥的鸡胰酶(Difco公司)[注意：含有叶酸轭合酶，用于水解叶酸多谷氨酸盐]，加入20mL磷酸缓冲液制成匀浆，3000r/min离心10min，取上清液备用。临用前现配。

(4) 蛋白酶－淀粉酶溶液：分别称取200mg蛋白酶(Sigma公司)和淀粉酶(Sigma公司)，加入20mL磷酸缓冲液制成匀浆，离心3000r/min 10min，取上清液备用。临用前配制。

(5) 2+8乙醇溶液：量取20mL无水乙醇溶液，加入80mL水混匀。

(6) 0.01mol/L NaOH：称取0.4g氢氧化钠，加2+8乙醇溶液溶解并稀释至1L。

(7) 10mol/L NaOH：称取400g氢氧化钠，加水溶解并稀释至1L。

(8) 叶酸标准贮备液(200μg/mL)：准确称取200mg叶酸标准品(Sigma公司，纯度大于98%)，用0.01mol/L NaOH溶解并定容至1L。贮存于棕色瓶中。

(9) 叶酸标准中间液(200ng/mL)：准确吸取1.0mL叶酸标准贮备液，用0.01mol/L NaOH溶解并定容至1L。贮存于棕色瓶中。待标定。标定：准确吸取1mL叶酸标准贮备液，用0.1mol/L NaOH定容至25mL。以0.1mol/L NaOH调零点，比色杯厚度1cm，波长256nm，测定3次紫外吸光度值，取平均值，按下式计算标准中间液浓度：

$$\rho = \frac{\bar{A}}{E} \times M_r \times 25 \times 10^3$$

式中 ρ——叶酸标准贮备液浓度，μg/mL；

$\bar{A}$——标准液平均紫外吸光度值；

E——摩尔消光系数24,500；

M_r——叶酸相对分子质量441.42；

25——测定紫外吸光度值时的稀释倍数；

10^3——由g/L换算成μg/mL的换算系数。

(10) 叶酸标准工作液(0.2ng/mL)：准确吸取1.0mL叶酸标准中间液，用磷酸缓冲液稀释定容至1L。

(11) 2.4mol/L HCl：量取20mL浓盐酸，加水稀释至100mL。

(12) 酶解酪蛋白溶液：将8g碳酸氢钠溶解于1L水中，加入60g去维生素

酪蛋白(Sigma 公司),用 10mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0[注意:调 pH 时应小心,不要过碱后再加酸反复调节,避免酪蛋白结块]。加入 300mg 胰酶,搅拌 20min,使胰酶混匀充分。再加入 2.5mL 甲苯,置 37℃恒温箱酶解 48～72h[注意:此步骤是将酪蛋白酶解为 *L.C* 可以利用的小分子肽。酶解时间不易超过 72h,如时间过长,配成的培养基不利于细菌生长]。将酪蛋白液从恒温箱中取出,121℃高压 30min 以终止反应并去除甲苯。冷却,加 10g 硅藻土搅拌,用垫有滤纸的布氏漏斗过滤。向滤液中加入约 60mL 冰乙酸调节 pH 至 3.7。称取活性炭 12g,加入滤液中搅拌 10min,用布氏漏斗过滤,重复 3 次。每次过滤时,布氏漏斗内加有 10g 硅藻土协助过滤。最后滤液用水稀释至 1200mL,4℃冰箱保存 1 年[注意:活性炭可吸附酪蛋白中的叶酸以减少试剂空白,同时也可吸附肽及氨基酸,应注意控制搅拌时间]。取 10mL 酶解后的酪蛋白溶液加入已称重的蒸发皿中,沸水浴蒸发至干。将蒸发皿置于 100℃恒温烤箱内干燥至恒重,在干燥器中冷却至室温。称量蒸发皿的质量,蒸发皿内固体质量,如固体质量小于 400mg,即每毫升酪蛋白溶液中固体含量＜40mg,则弃除酪蛋白液,重新制备。

(13) 黄嘌呤溶液:取 0.4g 黄嘌呤,加入 10mL 氨水,加热溶解,用水稀释至 100mL。冰箱保存。

(14) 腺嘌呤－鸟嘌呤－尿嘧啶:分别称取硫酸腺嘌呤,盐酸鸟嘌呤和尿嘧啶各 0.2g,加入 2.4mol/L HCl 溶液 10mL,加热溶解,用水稀释至 100mL,室温贮存。

(15) 乙酸缓冲液(1.7mol/L,pH4.5):38.65g 无水乙酸钠,19.8mL 冰乙酸,加水稀释至 500mL。

(16) 维生素溶液:取 10mg 核黄素溶解于 40 mL 乙酸缓冲液中。取0.2mg 生物素、2.5mg $NaHCO_3$、20mg 对氨基苯甲酸、40mg 盐酸吡多醇、4mg 盐酸硫胺素、8mg 泛酸钙、8mg 烟酸溶解于 50mL 水中。将上述两种溶液混合,加水至 100mL.

(17) 吐温－80 溶液:将 2g 吐温－80 加入 100mL 45℃水中,混匀。

(18) 还原型谷胱甘肽溶液:取 0.1g 还原型谷胱甘肽,加水至 100mL。

(19) 甲盐溶液:称取 5g 磷酸氢二钾和 2g 磷酸二氢钾,加水溶解至 100mL,液面上加入少许甲苯保存。

(20) 乙盐溶液:称取 2g 硫酸镁,0.5g 硫酸亚铁和 0.5g 硫酸锰,加水至 100mL;液面上加少许甲苯保存。

(21) 基础培养基:按下表配制,最终定容至 500mL。

酶解酪蛋白	100mL	*L*－盐酸半胱氨酸	0.2g
腺嘌呤－鸟嘌呤－尿嘧啶	2.5mL	色氨酸	0.2g
黄嘌呤溶液	2.5mL	还原型谷胱甘肽溶液	2.5mL
维生素溶液	5mL	葡萄糖	20g
吐温－80 溶液	2.5mL	乙酸钠	20g
L－天冬氨酸	0.3g	甲盐溶液	2.5mL

加水至250mL,搅拌,用10mol/L NaOH溶液调节pH 6.8±0.1,然后加入乙盐溶液2.5mL,磷酸缓冲液200mL,用水补至500mL。4℃冰箱内可保存一周[注意:甲、乙盐混合后易产生沉淀,所以配培养基时不可同时加入,加入甲盐后先调节pH再加入乙盐。基础培养基也可直接选购DIFCO公司生产的叶酸测定用培养基]。

(22) 琼脂培养基:

葡萄糖	1g	甲盐溶液	0.2mL
蛋白胨	0.8g	乙盐溶液	0.2mL
酵母提取物干粉	0.2g	琼脂	1.2g
乙酸钠(NaAc·3H_2O)	1.7g		

加水至100mL,置水浴煮至琼脂完全熔化,调节pH 6.8±0.1。尽快倒入试管中,每管3~5mL,塞上棉塞,121℃高压灭菌15min,取出后直立试管,冷却至室温。于冰箱内保存。

5. 菌种制备与保存

(1) 贮备菌种的制备:将L.C纯菌种转接至2个或多个琼脂培养基管中。(37±0.5)℃恒温培养箱中培养16~24h。贮于冰箱内,每周转种一次留作贮备菌种。

(2) 种子培养液的制备:取2mL叶酸标准使用液和10mL基础培养基,混匀,分装至4支5mL离心管中,塞上棉塞,121℃高压灭菌15min,实验时现制。

6. 操作步骤

所有操作均需避光进行。

(1) 样品制备:

① 强化剂型样品:称取0.1~0.5g样品(约含叶酸100~300ng)于100mL锥形瓶中,加入50mL磷酸缓冲液,混匀。121℃高压水解15min。定容至100mL,过滤。

② 果蔬类:称取样品0.2~2g(约含叶酸100~300ng),加磷酸缓冲液经高压水解后过滤,残渣用同样缓冲液再次高压,过滤。合并两次滤液,定容至100mL。

③ 谷、肉、蛋、鱼、豆、奶类等富含淀粉和/或蛋白类样品:称取样品0.1~2g(约含叶酸100~300ng),加磷酸缓冲液高压水解后,冷却。加入1mL鸡胰酶和1mL蛋白酶-淀粉酶液、1mL甲苯,充分混合,置于(37±0.5)℃恒温箱内酶解16~20h。酶解后定容至100mL过滤。另取一支试管,加入1mL鸡胰酶,1mL蛋白酶-淀粉酶和磷酸缓冲液,作酶空白。

④ 口服液、饮料、果汁等样品:称取样品0.5~2mL(约含叶酸100~300ng),加磷酸缓冲液高压水解后,冷却,加入1mL鸡胰酶,1mL甲苯,充分混合,置于(37±0.5)℃恒温箱内酶解16~20h。酶解后定容至100mL,过滤。另

取一支试管,加入 1mL 鸡胰酶和磷酸缓冲液,作酶空白。

(2) 根据样品叶酸含量,将上述滤液用磷酸缓冲液稀释到一定倍数,使叶酸终浓度为 0.1~0.4ng/mL。

(3) 样品管的制备:取 4 支试管,每支试管中分别加入稀释后样品液 1.0、2.0、3.0、4.0mL,补充水至体积为 5.0mL,加入 5mL 基础培养基,混匀。同样制作酶空白管。

(4) 灭菌:将以上标准系列管、样品管和酶空白管全部塞上棉塞,121℃高压灭菌 15min。

(5) 标准系列管的制备:取试管分别加入叶酸标准工作液 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL,相当于叶酸含量 0.0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ng,加水补至体积为 5.0mL,再加 5mL 基础培养基,混匀。如样品管一样进行灭菌。标准系列管进行平行测定。

(6) 接种:

① 接种液的制备:接种前一天,用灭菌的接种针将菌种由贮备菌种管中转种至 2 支已灭菌的种子培养液中,(37±0.5)℃恒温培养箱中培养 16~24 h。混悬种子培养液,无菌操作下用接种针管将 20 滴种子培养液转移至另 2 支无菌的种子培养液中,(37±0.5)℃再培养 6h。振荡混匀,制成菌种混悬液。立即使用[注意:叶酸是酪乳酸杆菌生长所必需的,但是如果培养基中叶酸含量过高,细菌可在体内贮存,使测定空白值,影响细菌生长曲线。将接种液转种再培养 6h,有利于消耗细菌体内贮存的叶酸]。

② 接种:在无菌操作条件下向每支已灭菌的标准系列管、样品管和酶空白管接种一滴上述接种液[注意:应直接滴在培养基内],混匀。留一支标准 0 管不接种,用于测定光密度时调零。

(7) 培养:置于(37±0.5)℃恒温培养箱中培养 20~40h。

(8) 测定:用分光光度计,在波长 540nm 下,以未接种的标准 0 管调节零点,测定标准管、样品管和酶空白管的光密度值。

7. 计算

(1) 绘制标准曲线:以标准系列管中叶酸含量为横坐标,光密度值为纵坐标,绘制叶酸标准曲线。

(2) 计算:根据样品管和酶空白管的光密度值,从标准曲线上查得相应的叶酸含量,按下式计算。

$$x = \frac{(m_1 - m_2) \times V_1 \times f}{m \times V_2} \times \frac{100}{1000}$$

式中 x——样品中叶酸含量,μg/100g;

m_1——从标准曲线上查得样品测定管中叶酸含量,ng;

m_2——从标准曲线上查得酶空白管中叶酸含量,ng;

V_1——样品制备时定容体积，mL；

f——稀释倍数；

V_2——制备样品测定管时加入的样品液体积，mL；

m——样品质量，g；

100/1000——样品含量由 ng/g 换算成 μg/100g 的系数。

8．注意事项

（1）同一实验室平行测定或重复测定结果相对偏差绝对值＜10%。

（2）微生物法的测定结果为总叶酸含量。

（3）微生物法测定叶酸常用的菌种除酪乳酸杆菌外还有粪链球菌（*Streptococcus faecalis*，S.F. ATCC 8043）。用酪乳酸杆菌测定灵敏度高，用粪链球菌测定重现性好。本方法选用酪乳酸杆菌，实验条件以适宜酪乳酸杆菌的生长条件而定。

（4）常用的酪蛋白处理方法有酶水解法、酸水解法和碱水解法，由于叶酸在碱性条件下相对稳定，所以用碱处理酪蛋白不能完全破坏叶酸，使培养基中叶酸含量偏高，标准空白值高，线性差。酸水解法和酶水解法均可有效去除叶酸，降解蛋白，使细菌生长曲线在 0～1ng 范围内线性良好，其中实验证明酶水解法更好。

（5）培养基的 pH 对细菌生长很重要，pH6.8～7.2，生长曲线最佳。pH 过低或过高均不利于细菌生长。

（6）本方法配制的培养基和 Difico 公司的叶酸培养基比较，标准曲线线性基本一致，对样品检测结果基本一致。

（7）食物中叶酸多以多谷氨酸盐形式存在，而酪乳酸杆菌只能利用叶酸单、双、三谷氨酸盐，所以对天然食品处理时先用轭合酶对叶酸进行降解。常用的轭合酶来源有血浆、鸡胰酶和猪肾酶。猪肾酶需从市售猪肾中提取，操作复杂，提取后对酶的鉴定相对困难，且重复性差，酶的用量难于控制。鸡胰酶可从 Difco 公司购买，可直接使用，重复性好。鸡胰酶的用量与叶酸测定结果相关，以往报告中认为水解 200ng 叶酸需加入 0.5～1mg 鸡胰酶。也有人认为在 pH7.0 的环境下增加酶的用量可提高叶酸水解率。本实验室认为水解 200ng 叶酸，鸡胰酶用量宜控制在 3～5mg 左右，过高可降低水解效果。

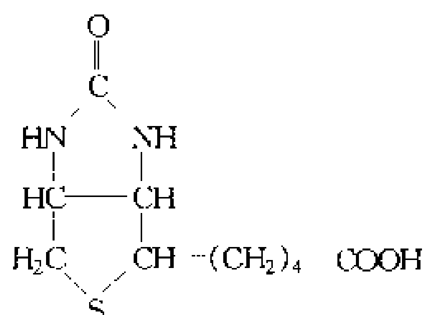
（8）轭合酶在应用中也有其局限性。天然食物中往往也含有轭合酶，在食物贮藏、运输过程中叶酸衍生物之间可发生相互转化，使外源性轭合酶作用下降；并且蔬菜水果存在一些酶的干扰物质也影响酶的活性，如柠檬酸、鞣酸等。所以测定中样品需注意保鲜，及时测定；样品处理方法也应视样品性质而定。

（9）蛋白酶、淀粉酶的应用可将包裹于蛋白、淀粉之间或与蛋白结合的叶酸

释放，有助于样品检测。蛋白酶、淀粉酶、鸡胰酶联合应用，水解效力大于3酶效力之和。

第八节　食物中生物素的测定方法（微生物测定法）

生物素又叫维生素H，广泛存在于各类食物中，有8个可能的立体异构体，但仅有一个存在于自然界中、并有生物活性，其结构式为：



生物素是一种白色结晶，相对分子质量为244.31，熔点为230～232℃，其干粉形式对空气、热和光相当稳定，但在溶液、强酸或强碱中很易于降解。微溶于水和95%乙醇，不溶于乙醚、丙酮、氯仿及乙酸乙酯。

目前，我国国标方法中尚无食物中生物素的测定方法。在国外，用于生物素测定的方法有微生物法、生物法、化学法、酶法。其中，生物法由于其实验周期长，人力、物力消耗多，所以早已被淘汰；化学法和酶法的灵敏度受样品种类变化的影响较大，因此这两种方法的适用范围较窄，有待于进一步改进。通常情况下，微生物测定法由于其灵敏度高、使用范围广而被普遍地用于食物中生物素的测定。在美国公职分析化学家协会的分析方法手册中（Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists）也采用了微生物法测定食物中的生物素。

1. 原理

生物素对于 *Lactobacillus plantarum*（ATCC 8014）的正常生长是一种必需的营养素，在一定生长条件下，*Lactobacillus plantarum* 的生长与繁殖速度与溶液中生物素的含量成一定的线性关系，通过利用浊度法或光密度法测定细菌生长和繁殖的强度可间接地测定出食物样品中的生物素含量。最低检出限为0.003ng。

2. 适用范围

本方法参考 *Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists*、*Methods of Vitamin Analysis* 以及 *Methods of the Microbiological Analysis of Selected Nutrients*，适用于测定各类食物及饲料中的生物素含量。

3．试剂

本试验所用水均为蒸馏水，所用试剂均需分析纯试剂。

（1）甲苯。

（2）1mol/L H_2SO_4 溶液：在600mL水中加入55.6mL浓硫酸，稀释至1000mL。

（3）3mol/L H_2SO_4 溶液：在600mL水中加入166.7mL浓硫酸，稀释至1000mL。

（4）10mol/L NaOH溶液：溶200g氢氧化钠于水中，定容至500mL。

（5）1∶1(1+1)乙醇溶液：500mL无水乙醇与500mL水充分混匀。

（6）酸解酪蛋白：称取50g不含维生素的酪蛋白于500mL烧杯中，加200mL 3mol/L盐酸，121℃高压水解6h。将水解物转移至蒸发皿内，在沸水浴上蒸发至膏状。加200mL水使之溶解后再蒸发至膏状，如此反复3次，以去除盐酸。以溴酚蓝作外指示剂，用10mol/L氢氧化钠调节pH至3.5。加20g活性炭，振摇，过滤，如果滤液不呈淡黄色或无色，可用活性炭重复处理。滤液加水稀释至500mL，贮存于试剂瓶中，加少许甲苯于4℃冰箱中保存[注意：酸解的目的是为了消除酪蛋白中的维生素，确保基本培养基中不含待测定的生物素，但有时酸水解不一定彻底，所以一定要选用不含维生素的酪蛋白粉(最好为Sigma公司产品)，这样可较好地确保酸解酪蛋白中不含生物素]。

（7）胱氨酸、色氨酸溶液：称取4g *L*－胱氨酸和1g *L*－色氨酸(或2g *DL*－色氨酸)于800mL水中，加热至70～80℃，逐滴加入1∶5(1+5)盐酸，不断搅拌，直至完全溶解为止。冷至室温，加水稀释至1000mL。加少许甲苯于4℃冰箱中保存。

（8）腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液：称取硫酸腺嘌呤(纯度为98%)、盐酸鸟嘌呤(生化试剂)以及尿嘧啶各0.1g于250mL烧杯中，加75mL水和2mL浓盐酸，然后加热使其完全溶解，冷却，若有沉淀产生，加盐酸数滴，再加热，如此反复，直至冷却后无沉淀产生为止，以水稀释至100mL，贮存于试剂瓶中，加少许甲苯于冰箱中保存。

（9）维生素溶液：称取20mg核黄素、10mg盐酸硫胺素、10mg对氨基苯甲酸、40mg盐酸吡哆醇，用0.02mol/L乙酸溶液溶解并定容至1000mL。

（10）盐溶液：称取10g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、1g KCl、0.5g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$、0.5g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 加23mL 85% H_3PO_4，用水溶解并定容至500mL。

（11）生物素标准溶液：

溶液名称	浓　度	配 置 方 法
标准贮备溶液	50μg/mL	称取25mg无水生物素用(1+1)乙醇溶液定容至500mL，于4℃冰箱中贮存

续表

溶液名称	浓　　度	配 置 方 法
标准中间液Ⅰ	1μg/mL	取 5mL 贮备液用(1+1)乙醇溶液定容至 250mL，于 2～4℃ 冰箱中贮存
标准中间液Ⅱ	10ng/mL	取 5mL 中间液Ⅰ用(1+1)乙醇溶液定容 500mL，于 2～4℃ 冰箱中贮存
标准工作液	1ng/mL	取 5mL 中间液Ⅱ用去离子水定容至 50mL，在 2～4℃ 冰箱中贮存

（12）基本培养基：将下列试剂混合于 500mL 烧杯中，加水至 200mL，以溴麝香草酚蓝作外指示剂，用 10mol/L 氢氧化钠液调节 pH 至 6.8，用水稀释至 250mL。

酸解酪蛋白	25mL
胱氨酸、色氨酸溶液	25mL
腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液	5mL
维生素溶液	5mL
盐溶液	5mL
无水葡萄糖	5g
无水醋酸钠	5g

此培养基也可从 Difco 公司购得，产品号为 No.0419－15－8[注意：由于国内的某些试剂的纯度不够，所以自行配制的培养基较浑浊，且常有刺激细菌生长的物质存在，因此严重影响到最后的浊度测定结果，建议使用商品化培养基]。

（13）琼脂培养基：在 600mL 水中，加入 15g 蛋白胨、5g 水溶性酵母提取物干粉、10g 无水葡萄糖、2g 无水磷酸二氢钾、100mL 番茄汁、10mL 吐温－80、5.0～7.5g 琼脂，加热溶解，用(2+3)氢氧化钠调节 pH 为 6.5～6.8，然后定容至 1000mL，分装于试管，于 121℃ 高压灭菌 10min，取出后竖直试管，待冷却至室温后于冰箱 2～4℃ 保存。

（14）生理盐水：称取 9.0g 氯化钠溶于 1000mL 水中，。每次使用时分别倒入 2～4 支 10mL 试管中，每支约加 10mL，塞好棉塞，于 121℃ 高压灭菌 10min，备用。

（15）0.4g/L 溴麝香草酚蓝溶液：称取 0.1g 溴麝香草酚蓝于小研钵内，加 1.6mL 0.1mol/L 氢氧化钠研磨，加少许水继续研磨，直至完全溶解，用水稀释至 250mL。

（16）0.4g/L 溴甲酚绿溶液：称取 0.1g 溴甲酚绿于小研钵中，加 1.4mL 0.1mol/L NaOH 研磨，加少许水继续研磨，直至完全溶解，用水稀释至 250mL。

（17）1g/L 溴酚蓝乙醇溶液：称取 0.1g 溴酚蓝，用乙醇溶解后，加乙醇稀释至 100mL。

（18）番茄汁：将新鲜番茄去皮、去子后，制成匀浆，用纱布多次过滤，直至滤液呈淡黄色透明液体，滴加几滴甲苯于液体表面，放置冰箱中冷冻保存。

4．仪器与设备

（1）实验室常用设备。

（2）电热恒温培养箱。

（3）压力蒸汽消毒器。

（4）液体快速混合器。

（5）离心机。

（6）分光光度计。

（7）硬质玻璃试管：20mm×150mm。

5．菌种与培养液的制备与保存

（1）贮备菌种的制备：*Lactobacillus plantarum*（ATCC 8014）接种于直面琼脂培养管中，在（37±0.5）℃恒温箱中培养16～24h，取出后放入冰箱中保存，每隔一周至少传种一次。在实验前一天必须传种一次。

（2）种子培养液的制备：加2mL生物素标准应用液和3mL基本培养基于10mL离心管中，塞好棉塞，于121℃高压灭菌10min，取出，冷却后于冰箱中保存。每次制备两管，备用［注意：加入离心管中的生物素标准液要适量，过少会影响 *Lactobacillus plantarum* 的生长，过多会使零管中的光密度值增大，影响测定结果的准确性。一般2～3mL标准工作液即可］。

6．操作步骤

（1）接种液的配制：使用前一天，将已在琼脂管中生长16～24h的 *L. plantarum* 接种于种子培养液中，在（37±0.5）℃培养16～24h，取出后离心10min（3000r/min），弃去上清液，用已灭菌的生理盐水淋洗2次，再加入3mL灭菌生理盐水，混匀后，将此液倒入已灭菌的注射器中，立即使用［注意：菌种的淋洗一定要彻底，否则部分残留在细菌表面的生物素会使空白管的光密度值升高，影响结果的准确性］。

（2）样品制备：称取适量样品，放入100mL三角瓶中，加50mL 1mol/L H_2SO_4［注意：水解动物样品用3mol/L H_2SO_4，水解植物样品及混合型样品用1mol/L H_2SO_4］，混匀后于121℃高压水解90min，取出冷却至室温。以溴甲酚绿为外指示剂，用10mol/L NaOH溶液调节pH为4.5，将水解液移至100mL容量瓶中，定容，过滤。样品水解液只能在4℃冰箱保存2～3d。取适量水解液于25mL具塞刻度试管中，以溴麝香草酚蓝为外指示剂，用10mol/L NaOH调节至pH为6.8，用水稀释至刻度。

（3）样品试管的制备：于平行样品管中分别加入1.0、2.0、3.0、4.0mL样品水解液，加水至5mL，然后再加入5mL基本液体培养基。

（4）标准系列管的制备：每组试管中分别加入生物素标准工作液0.0、

1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL(相当于0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ng)加水至5mL，再加入5 mL基本液体培养基，需做三组标准曲线。

(5) 灭菌：样品管与标准系列管均用棉塞塞好，于121℃条件下高压灭菌10min[注意：灭菌时间不宜过长，否则会破坏基本培养基中的营养成分，影响*Lactobacillus plantarum*的生长，最好在5～10min内]。

(6) 接种与培养：待试管冷至室温后，每管接种一滴种子液，于(37±0.5)℃恒温箱中培养16～20h[注意：① 接种前，接种室要在紫外灯下消毒至少30min。② 在接种时，其中一支标准系列0管可不接种，这样可观察此次实验是否存在污染，并且可消除由于管中液体的颜色造成的误差]。

(7) 测定：分光光度计，波长550nm条件下，以标准系列0管调零测定样品管及标准管的光密度值[注意：首先以未接种的标准系列0管进行仪器调零，然后再用接种后的标准系列0管进行二次调零，之后再测定其他管中液体的光密度值。2次调零的目的在于彻底消除液体本身的颜色及污染对实验结果的影响]。

7. 计算

以生物素标准系列的不同质量(ng)为横坐标，光密度值为纵坐标，绘制标准曲线。在曲线上查出相对应的样品测定管中的生物素含量，然后再按以下公式计算样品中生物素含量：

$$x = \frac{m_1 \cdot V \cdot f}{m \times 1000} \times 100$$

式中　x——样品中生物素含量，μg/100g；

m_1——测定管中的生物素含量，ng；

V——样品水解液的定容体积，mL；

f——样品液的稀释倍数；

m——样品质量，g；

100/1000——单位换算系数。

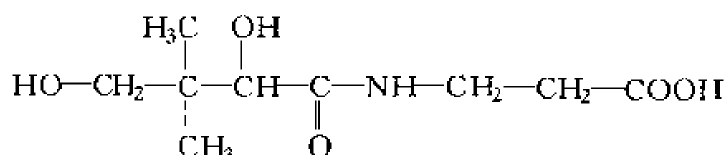
8. 注意事项

在实验过程中，一定要注意避免油脂的污染，因为当有油脂存在时，会刺激*Lactobacillus plantarum*(ATCC 8014)快速生长，导致其生长速度不再与生物素的含量呈线性关系。因此在实验前，要检查所用玻璃器皿的表面是否已彻底清洗，操作者的双手不要涂抹各种护手霜，以防此类油脂进入被测液体中。

第九节　食物中泛酸的测定方法(微生物测定法)

泛酸的化学名称是二羟基-β，β-二甲基丁酰-β′-丙氨酸，相对分子质量为219。结构式如下：





泛酸是一种黄色黏滞油状物，但它的盐是无色晶体，泛酸钙是主要的商品形式。泛酸钙不溶于有机溶剂，而溶于乙醇和水，在干燥的条件下，泛酸盐对空气和光稳定。泛酸的水溶液在酸性和碱性情况下对热不稳定，易于分解，但泛酸的类似物泛醇在溶液中很稳定。

测定泛酸的方法包括微生物法、放免法(RIA 法)、酶联免疫法(ELISA 法)、高效液相色谱法、荧光法及分光光度法等。其中，荧光法、分光光度法和高效液相色谱法普遍地用于药品、营养强化剂中泛酸的测定，此类样品中的泛酸多以游离态存在，干扰物较少，但这几种方法并不适用于成分复杂的食物样品。ELISA 法是近年来新建立的方法，已有初步实验结果表明它适于测定血样及某些食物样品提取液中的泛酸，但此方法还需要进一步地改进和完善。因此，目前国际上通常将微生物法和 RIA 法用于食物中泛酸的测定，这两种方法的测定结果具有良好的相关性。实验室可根据待测样品的物理特性、已有的设备情况及经济条件来选择其一。和 RIA 法相比，微生物法具有操作简单、费用低、安全、数据准确可靠等优点，因此选用了微生物测定法。

1．原理

泛酸对于 *Lactobacillus plantarum*(ATCC 8014)的正常生长是一种必需的营养素，在一定生长条件下，*Lactobacillus plantarum* 的生长与繁殖速度同样品中泛酸的含量成一定的线性关系，通过利用浊度法或光密度法测定细菌增殖的强度即可间接地检测出食物样品中泛酸的含量。本方法最低检出限为 5ng。

2．适用范围

本方法参考 *Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists*、*Methods of Vitamin Analysis* 以及 *Methods of the Microbiological Analysis of Selected Nutrients*。本方法适用于测定各类食物(包括天然食物及加工食物)及饲料中的泛酸含量。

3．试剂

本试验用水均为蒸馏水，所用试剂均需分析纯试剂。

(1) 甲苯。

(2) 1mol/L HCl 溶液。

(3) Tris 缓冲溶液：将 24.2g 三羟基氨基甲烷溶于 150mL 水中，用7.5mol/L NaOH 调 pH 至 8.0~8.3，然后定容至 200mL，贮存于 4℃冰箱中，可保存 2 周。

(4) 7.5mol/L NaOH 溶液：溶 150g 氢氧化钠于水中，定容至 500mL。



(5) 0.2mol/L CH_3COOH：12mL 冰醋酸用水定容至 1000mL。

(6) 0.2mol/L CH_3COONa 溶液：将 16.4g 醋酸钠用水定容至 1000mL。

(7) 0.2mol/L $KHCO_3$ 溶液：称取 10.012g 碳酸氢钾溶于水中，然后定容至 500mL。

(8) 2%碱性磷酸酶溶液：称取 2g 碱性磷酸酶(Sigma 公司 No. P－3877)溶于水中，然后定容至 100mL。贮存于 4℃冰箱中保存。

(9) 10%鸽子肝脏提取物溶液：将所用容器在配制此试剂前一天放入 4℃冰箱中过夜。

① 称取 30g 鸽子肝脏丙酮提取物粉末(Sigma 公司，No. L－8376)放入冷的研钵中，分 2 次加入 300mL 0.2mol/L $KHCO_3$，至 0℃的冰浴中研磨均匀直至呈悬浊液。

② 将此悬浊液分别放入 8 支离心管中，塞紧后充分振摇，冷冻 10min，然后 3000r/min 离心 5min。

③ 将上清液放入 500mL 预冷的广口烧瓶中，加 150g 活性 Dowex1－X8(Bio－Rad Laboratories, Inc., Brussels, Belgium)，放在冰浴中振摇 5min；将混合液倒入离心管中，3000r/min 离心 5min。

④ 再将上清液移入另一个冷的 500mL 广口烧瓶中，冷冻 10min。

⑤ 重复上述③、④步骤一次。

⑥ 然后分装于试管中，冷冻条件下保存，用前化冻。

(10) 酸解酪蛋白液：称取 50g 不含维生素的酪蛋白于 500mL 烧杯中，加 200mL 3mol/L HCl，于压力蒸汽消毒器内 10.3×10^4Pa(15 lb/in^2)压力下水解 6h。将水解物转移至蒸发皿内，在沸水浴上蒸发至膏状。加 200mL 水使之溶解后再蒸发至膏状，如此反复 3 次，以去除盐酸。以溴酚蓝作外指示剂，用10mol/L氢氧化钠调节 pH 至 3.5。加 20g 活性炭，振摇，过滤，如果滤液不呈淡黄色或无色，可用活性炭重复处理。滤液加水稀释至 500mL，贮存于试剂瓶中，加少许甲苯于冰箱中保存[注意：酸解的目的是为了去除酪蛋白中的维生素，使基本培养基中不含待测定的维生素，但有时酸水解不一定彻底，所以一定要选用不含维生素的酪蛋白粉，这样可较好地确保酸解酪蛋白中不含生物素]。

(11) 胱氨酸－色氨酸溶液：称取 4g *L*－胱氨酸和 1g *L*－色氨酸(或 2g *dl*－色氨酸)于 800mL 水中，加热至 70～80℃，逐滴加入(1＋5)的盐酸，不断搅拌，直至完全溶解为止。冷至室温，加水稀释至 1000mL。加少许甲苯于冰箱中保存。

(12) 腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液：称取硫酸腺嘌呤(纯度为 98%)、盐酸鸟嘌呤(生化试剂)以及尿嘧啶各 0.1g 于 250mL 烧杯中，加 75mL 水和 2mL 浓盐酸，然后加热使其完全溶解，冷却，若有沉淀产生，加盐酸数滴，再加热，如此反

复,直至冷却后无沉淀产生为止,以水稀释至100mL。加少许甲苯于冰箱中保存。

(13) 吐温-80溶液:将25g吐温-80溶于乙醇中并定容至250mL。

(14) 维生素溶液Ⅰ:称取20mg核黄素,10mg盐酸硫胺素,0.04mg生物素,用0.2mol/L醋酸溶液溶解并定容至1000mL。

(15) 维生素溶液Ⅱ:10mg对氨基苯甲酸,50mg烟酸,40mg盐酸吡哆醇,溶于(1+3)的乙醇溶液,并定容至1000mL。

(16) 盐溶液A:称取25g磷酸二氢钾和25g磷酸氢二钾溶于500mL水中,加5滴浓盐酸。

(17) 盐溶液B:称取10g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、1g KCl、0.5g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$,0.5g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、23mL 85% H_3PO_4,溶于水中并定容至500mL。

(18) 泛酸标准溶液:

溶液名称	浓　度	配 置 方 法
标准贮备液	40μg/mL	称取43.47mg *D*-泛酸钙(Sigma公司,No. P-2250)标准物,溶解于500mL水中,加入10mL 0.2mol/L的醋酸,100mL 0.2mol/L CH_3COONa,然后用水定容至1000mL,此时溶液的泛酸钙浓度为43.47μg/mL,相当于泛酸浓度为40μg /mL,贮存于2～4℃冰箱中
标准中间液	1.0μg/mL	取25mL贮备液放入500mL水中,再加入10mL 0.2mol/L的醋酸,100mL 0.2mol/L CH_3COONa,然后用水定容至1000mL,在2～4℃冰箱中贮存
标准工作液	10ng/mL	取1mL中间液用水定容至100mL,在2～4℃冰箱中贮存

(19) 基本培养基:将下列试剂混合于500mL烧杯中,加水至200mL,以溴麝香草酚蓝作外指示剂,用10mol/L氢氧化钠液调节pH至6.8,用水稀释至250mL。

酸解酪蛋白	25mL
胱氨酸、色氨酸溶液	25mL
腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液	5mL
维生素溶液Ⅰ	5mL
维生素溶液Ⅱ	5mL
盐溶液A	5mL
盐溶液B	5mL
无水葡萄糖	10g
三水醋酸钠	8.3g
吐温-80溶液	0.25mL

此培养基也可从Difco公司购得,产品号为0816-15-7[注意:由于国内的某些试剂纯度不够,所以自行配制的培养基较浑浊,严重影响到最后的浊度测定结果,因此建议使用进口培养基]。



（20）琼脂培养基：在600mL水中，加人15g蛋白胨，5g水溶性酵母提取物干粉，10g无水葡萄糖，2g无水磷酸二氢钾，100mL番茄汁，10mL吐温－80，加热溶解，用40％氢氧化钠调节pH为6.5～6.8，然后定容至1000mL，每500mL液体培养基加5.0～7.5g琼脂，于121℃高压灭菌10min，取出后竖直试管，待冷却至室温后于冰箱2～4℃条件下保存。

（21）生理盐水：称取9.0g氯化钠溶于1000mL水中，每次使用时分别倒人2～4支10mL试管中，每支约加10mL，塞好棉塞，于121℃高压灭菌10min，备用。

（22）0.04％溴麝香草酚蓝溶液：称取0.1g溴麝香草酚蓝于小研钵内，加1.6mL 0.1mol/L氢氧化钠研磨，加少许水继续研磨，直至完全溶解，用水稀释至250mL。

（23）0.04％溴甲酚绿溶液：称取0.1g溴甲酚绿于小研钵中，加1.4mL 0.1mol/L氢氧化钠研磨，加少许水继续研磨，直至完全溶解，用水稀释至250mL。

（24）0.1％溴酚蓝乙醇溶液：称取0.1g溴酚蓝，用乙醇溶解后，加乙醇稀释至100mL。

（25）番茄汁：将新鲜番茄去皮、去子，制成匀浆后，用纱布过滤数次，直至呈淡黄色透明液体，在液面上加几滴甲苯，冷冻保存。

4. 仪器与设备

（1）实验室常用设备。

（2）电热恒温培养箱。

（3）压力蒸汽消毒器。

（4）液体快速混合器。

（5）离心机。

（6）722分光光度计。

（7）硬质玻璃试管：20mm×150mm。

5. 菌种与培养液的制备与保存

（1）贮备菌种的制备：*Lactobacillus plantarum*（ATCC 8014）接种于直面琼脂培养管中，在（37±0.5）℃恒温箱中培养16～24h，取出后放人冰箱中保存，每隔2周至少传种一次。在实验前一天必须传种一次。

（2）种子培养液的制备：加2mL泛酸标准工作液和3mL基本培养基于10mL离心管中，塞好棉塞，于121℃高压灭菌10min，取出，冷却后于冰箱中保存。每次制备两管，备用［注意：加入离心管中的泛酸标准液要适量，过少会影响 *Lactobacillus plantarum* 的生长，过多则不宜于洗净残余泛酸，因此会使零管中的光密度值增大，影响测定结果的准确

性。一般 2～3mL 标准工作液即可]。

6. 操作步骤

(1) 接种液的配制：使用前一天，将已在琼脂管中生长 16～24h 的 *L. plantarum* 接种于种子培养液中，在(37±0.5)℃培养 16～24h，取出后离心 10min(3000r/min)，弃去上清液，用已灭菌的生理盐水淋洗 2 次，再加入 3mL 灭菌生理盐水，混匀后，将此液倒入已灭菌的注射器中，立即使用。

(2) 样品制备：称取适量样品，放入 100mL 三角瓶中，加 10mL Tris 缓冲液，加蒸馏水 30mL，混匀于 121℃高压条件下水解 15min，取出冷却至室温，定容至 50mL，过滤[注意：泛酸在空气中稳定，但对于热不稳定，因此水解时间切勿过长]。

取 1mL 水解液，加入 0.4mL 碱性磷酸酶溶液，0.2mL 肝脏提取物溶液，0.1 mL 碳酸氢钠溶液，0.4mL 蒸馏水，混匀后，37℃温箱中培养过夜。

加水至 20mL，以溴甲酚绿为外指示剂，用冰醋酸调节 pH＝4.5，定容至 25mL，过滤。

取适量滤液于 25mL 具塞刻度试管中，以溴麝香草酚蓝为外指示剂，用0.1 mol/L 氢氧化钠调节至 pH＝6.8，用水定容至某刻度。

样品试管的制备：于平行样品管中分别加入 1.0、2.0、3.0、4.0 mL 制备好的样品液，加水至 5mL，然后再加入 5mL 基本液体培养基。

(3) 标准管的制备：每组试管中分别加入泛酸标准工作液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL(相当 0.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0ng 泛酸)，加水至 5mL，再加入 5mL 基本液体培养基，需做三组标准曲线。

(4) 灭菌：样品管与标准管均用棉塞塞好，于 121℃高压灭菌 10min[注意：灭菌时间不宜过长，否则会破坏基本培养基中的营养成分，影响 *Lactobacillus plantarum* 的生长，最好在 5～10min 内]。

(5) 接种与培养：待试管冷至室温后，每管接种一滴种子液，于(37±0.5)℃恒温箱中培养 16～20h[注意：① 接种前，接种室要在紫外灯下消毒至少 30min。② 在接种时，其中一支标准系列 0 管可不接种，这样可观察此次实验是否存在污染，并且可消除由于管中液体的颜色造成的误差]。

(6) 测定：722 分光光度计，波长 640nm 条件下，以标准系列 0 管进行仪器调零，测定样品管及标准管的吸光度值[注意：首先以未接种的标准系列 0 管进行仪器调零，然后再用接种后的标准系列 0 管进行 2 次调零，之后再测定其他管中液体的吸光度值]。

7. 计算

以泛酸标准系列的不同纳克数为横坐标，吸光度值为纵坐标，制作标准曲线。在曲线上查出相对应的样品测定管中的泛酸含量，然后再按以下公式计算样品中泛酸含量：



$$X = \frac{m' \cdot V \cdot f}{m \times 1000} \times 100$$

式中　X——样品中泛酸含量，μg/100g；

m'——测定管中的泛酸含量，ng；

V——样品水解液的定容体积，mL；

f——样品液的稀释倍数；

m——样品质量，g；

100/1000——单位换算系数。

第十节　总胆碱的测定方法

胆碱是一种强有机碱，存在于磷脂中，又是乙酰胆碱的前体，同时具有维生素的特性。胆碱在化学上为（β－羟乙基）三甲基胺的氢氧化物，其分子式为 $HOCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$。胆碱呈无色味苦的白色浆液，易溶于水，具有很强的吸湿性。胆碱易与酸反应生成更稳定的结晶盐（如氯化胆碱），在强碱条件下也不稳定，但对加热和贮存稳定。

胆碱广泛存在于各类食物中，尤其是动物性食物。食物中胆碱的测定方法主要有酶法、比色法。酶法的原理是将胆碱在胆碱氧化酶的作用下产生过氧化氢，后者在过氧化物酶的作用下使发色剂显色，在一定波长下测定显色的吸光度值，与胆碱浓度呈正比。此法敏感、特异性高，但是胆碱氧化酶价格比较贵，国内较难买到。本书中介绍比色法测定食物中胆碱含量，包括结合型和游离型胆碱，最小检出限为 0.15mg。

1．原理

食物中的胆碱经过碱处理提取后，通过 Florisil 柱色谱纯化，然后用雷纳克盐（Reineckate）与胆碱反应形成粉红色的胆碱－雷纳克盐复合物，这种复合物被丙酮洗脱后，在 526nm 有最大吸收，其吸收值与胆碱浓度成正比。

2．适用范围

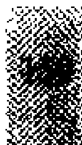
参照 *Methods of Vitamin Assay*，适用于各类食物中胆碱的测定。

3．仪器与设备

（1）实验室常用设备。

（2）回流提取装置。

（3）色谱柱：为 0.8cm（内径）×30cm 的玻璃柱，柱上端为体积 30～50mL 的贮液池，底端收缩变细，并装有活塞。活塞上约 1cm 处有一玻璃筛板，筛板孔径为 16～30μm。



(4) 分光光度计。

4. 试剂

除特殊说明外,所有试剂均为分析纯,实验用水为蒸馏水。

(1) 甲醇。

(2) 氯仿。

(3) 乙酸甲酯。

(4) 丙酮:用前重蒸馏。

(5) 10%丙酮:取50mL丙酮溶解于450mL水中。

(6) 冰乙酸。

(7) 冰乙酸-甲醇溶液:取50mL冰乙酸和400mL甲醇混合。

(8) 饱和氢氧化钡提取液:于1000mL甲醇中加入40g无水$Ba(OH)_2$,搅拌10min,再加入100mL氯仿,混合,使$Ba(OH)_2$饱和,过滤去除多余的$Ba(OH)_2$。

(9) 硅镁吸附剂(Florisil):Sigma公司,60~100目。

(10) 雷纳克铵(Ammonium Reineckate)饱和溶液:称取2~3g雷纳克铵,加入100mL水中,搅拌10min,过滤去除多余的雷纳克铵。实验当日配制。

(11) 胆碱标准贮备液(5g/L):准确称取无水氯化胆碱0.57613g,溶解于水中,并定容至100mL。冰箱保存。

(12) 胆碱标准工作液(1g/L):准确吸取2.0mL标准贮备液,用水稀释定容至100mL。

5. 测定步骤

所有操作均需避光进行。

(1) 提取:称取适量样品(约含5~50mg胆碱),置于100mL具塞锥型瓶中,加入30mL提取液,边加边摇,避免结块。然后放置于76~80℃恒温水浴回流2~4h,回流速度为1~2滴/s[注意:加热回流的温度应严格控制在80℃左右,否则样品易扑溅,造成损失。样品提取率与回流时间有关,回流2h,提取率达到最高值,回流3~4h,可以保证样品提取较完全]。冷却,样品过滤至100mL容量瓶中,反复用5~10mL冰乙酸-甲醇溶液洗涤锥形瓶和滤渣,滤液并入容量瓶中。用pH试纸测定提取液pH在2~6范围之内[注意:必要的话可加入冰乙酸调节pH],然后用甲醇定容至刻度。

(2) 纯化:

① 填装色谱柱:将硅镁吸附剂浸入甲醇中,湿法将硅镁吸附剂填充入色谱柱中[注意:色谱柱最好经过干燥处理,否则影响洗脱液流速],至硅镁吸附剂的高度达10cm(约4g)。用甲醇冲洗色谱柱,并保持甲醇高于硅镁吸附剂顶端0.5~1cm。

② 色谱柱纯化:吸取一定量的提取液加到色谱柱中,打开底端活塞,使提取液靠重力作用通过色谱柱。先后用5、10mL甲醇洗涤色谱柱。待甲醇通过色



谱柱后，依次用2份10mL乙酸甲酯，10mL冷的10%丙酮洗涤色谱柱。接着加入5mL雷纳克铵饱和溶液[注意：雷纳克铵与吸附于色谱柱上的胆碱结合]，待雷纳克铵饱和溶液完全通过色谱柱后，用2份10mL冰乙酸洗涤直至流出液清亮为止[注意：冰乙酸的作用是洗脱未与胆碱结合的过量的雷纳克铵，应注意洗脱完全]。用15mL丙酮洗脱色谱柱上胆碱－雷纳克盐复合物的粉红色色谱带，收集洗脱液，并用丙酮定容至15mL。

（3）比色测定：用1cm比色杯，以丙酮调节零点，于526nm波长下，测定样品吸光度，其值在标准工作曲线上查出，或通过回归方程计算出对应的胆碱含量，供计算使用。

（4）标准工作曲线：分别吸取0.50、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL标准工作液，加至色谱柱上，按照上述样品测定步骤操作。以胆碱含量为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制标准曲线，计算回归方程。

6．结果计算

$$x = \frac{m_1 \times V_1 \times 100}{V_2 \times m} \times 100$$

式中 x——样品中胆碱的含量，mg/100g；

m_1——从标准工作曲线或回归方程中查到的胆碱含量，mg；

V_1——样品提取液的总体积，mL；

V_2——纯化用提取液的体积，mL；

m——样品质量，g。

7．结果的允许差

同一实验室平行测定或重复测定结果的相对偏差绝对值<10%。

8．注意事项

（1）硅镁吸附剂填充的高度关系到洗脱液的用量，如果填充过高，则应加大洗脱液用量，以保证胆碱的纯化和完全洗脱。

（2）纯化过程中冰乙酸的作用是将不能与胆碱形成复合物的多余雷纳克铵盐洗脱，丙酮则是洗脱胆碱－雷纳克铵复合物，如果这两步洗脱不完全，均影响胆碱的测定，所以必要时应增加冰乙酸和丙酮的用量以保证测定结果。

第六章　灰分及无机成分

食物中常见的矿物质约有20余种,按照每日膳食需要量在100mg以上的称为常量元素,如钙、磷、镁、钾、钠、氯、硫等。1990年FAO/WHO国际组织专家委员会的新定义,微量元素按照其生物学作用分为:1)人体必需微量元素共有8种:碘、锌、硒、铁、铜、钼、铬和钴。2)可能必需的元素共5种:锰、硅、硼、钒及镍。3)具有潜在毒性,但低剂量时可能是人体必需的元素7种:氟、铅、镉、汞、砷、铝及锡。

本章着重介绍食物中常见的或食品卫生标准规定检验的元素。

第一节　灰分的测定方法

灰分用灼烧质量法测定。

1. 原理

食品经灼烧后所残留的无机物质称灰分。

2. 适用范围

本法参照GB 5009,4—85,适用于各类食品中灰分的测定。

3. 仪器

(1) 灰化炉。

(2) 电炉。

(3) 干燥器。

(4) 瓷坩埚。

(5) 万分之一电子天平。

4. 操作步骤

(1) 将用1:4盐酸煮过的坩埚洗净,在灰化炉内550~600℃灼烧0.5h,待炉温降至200℃以下时,将坩埚移入干燥器内,冷至室温,精密称重。

(2) 加人1~3g样品后精密称重,液体样品须先在沸水上蒸干。

(3) 用电炉将样品充分炭化至无烟,移置灰化炉中,550~600℃灼烧4h至无碳粒,在200℃以下时移入干燥器内,待至室温称重。重复灼烧2h,再次称重。重复灼烧至前后2次称重相差不超过0.5mg为恒重。

5. 计算

$$灰分\% = \frac{坩埚质量加灰分质量 - 空坩埚质量}{样品质量} \times 100$$

6. 举例

设取样品 2.2214 g，空坩埚质量 20.5377g，坩埚质量加灰分质量为 20.5634g。

$$灰分\% = \frac{20.5634 - 20.5377}{2.2214} \times 100 = 1.2\%$$

7. 注意事项

(1) 灼烧温度不得超过 600℃，如超过则磷酸盐熔化，钾、钠也能挥发，致使测得结果产生误差。

(2) 含水分甚多的水果、蔬菜称量要大，否则结果误差大。

第二节　钙的测定方法

一、原子吸收光谱分光光度法

1. 原理

每种元素的原子能够吸收特定波长的光能，而吸收的能量值与该光路中该元素的原子数目成正比。用特定波长的光照射这些原子，测量该波长的光被吸收的量，与标准溶液制成的校正曲线对比，求出被测元素的含量。

2. 适用范围

依据中华人民共和国国家标准：GB12398—90，此方法适用于所有食品及保健品中元素含量的测定，其元素含量在 1mg/kg 浓度以上。

3. 仪器

原子吸收光谱分光光度计。

4. 试剂

(1) 硝酸(G.R)，高氯酸(G.R)，盐酸(G.R)。

(2) 混合酸消化液：硝酸 + 高氯酸 按 4 + 1 混合。

(3) 0.01mol/L 8 - 羟基喹啉溶液配制：

① 配制 1mol/L HCl 溶液。

② 称 1g 8 - 羟基喹啉，用 1mol/L HCl 定容至 10mL。

③ 将上述溶液倒入容量瓶，定容至 1000mL。

(4) 1% 镧溶液：准确称量 11.725gLa_2O_3(纯度为 99.99%)，加 25mL 盐酸，使之溶解，用去离子水定容至 1000mL。

(5) 去离子水：80(kΩ)以上。

(6) 标准质控物：猪肝粉(国家标准物质研究中心提供)，质控物室温干燥保存。

(7) 国家标准物质研究中心提供：钙标准储备液，浓度为1000μg/mL。

(8) 标准中间液配制：吸取以上钙标准溶液0.25mL，移入10 mL容量瓶中，然后用稀释用溶液(1%镧或0.01mol/L 8－羟基喹啉)定容至10 mL。标准溶液须放在聚乙烯瓶内，4℃冰箱保存。

5. 操作步骤

(1) 样品消化：实验操作需在无元素污染的环境中进行。准确称取样品干样0.3～0.7g，湿样1.0g左右，饮料等其他液体样品1.0～2.0g，然后将其放入50mL消化管中，加混酸15mL[注意：油样或含糖量高的食品可多加些酸]，过夜。次日，将消化管放入消化炉中，消化开始时可将温度调低(约130℃左右)，然后逐步将温度调高(最终调至240℃左右)进行消化，一直消化到样品冒白烟，液体变成无色或黄绿色为止。若样品未消化完全可再加几毫升混酸，直到消化完全。消化完后，待凉，再加5mL去离子水，继续加热，直到消化管中的液体约剩2mL左右，取下，放凉，然后转移至10mL试管中，再用去离子水冲洗消化管2～3次，并最终定容至10mL。

样品进行消化时，应同时做样品空白消化。

(2) 测定：将标准中间液配置成不同浓度系列的标准工作液，以备上机使用(表6－1)。

表6－1　不同浓度系列标准工作液的配制

元素	中间液浓度/(μg/mL)	吸取量/mL	稀释体积/mL	工作液浓度/(μg/mL)	稀释用溶液
Ca	25	1.0	25	1.0	1%镧溶液或
		2.0		2.0	0.01mol/L
		3.0		3.0	8－羟基喹啉
		5.0		5.0	溶液

实验条件及方法：测定钙的波长为422.7nm，仪器狭缝为0.5nm，灯位置及灯电流等均按仪器使用说明调至最佳状态，然后点火准备测定，首先，以各标准系列溶液绘制标准曲线，然后逐一测定空白及样品，样品及空白均应先用8－羟基喹啉或1%镧溶液稀释定容后上机测定。

6. 公式

根据仪器测定出的数据，代入公式进行计算。

$$x = \frac{(\rho - \rho_0) \times V \times f \times 100}{m \times 1000}, (\text{mg}/100\text{g})$$

式中　ρ——测定样品中元素的浓度 mg/L；

ρ_0——空白值；

V——样品定容体积 mL；

f——稀释倍数；

m——取样量，g（固体重量为 g，液体为 mL）。

钙的最低检出限为 0.1μg/mL。

7. 注意事项

样品处理要防止污染，所用器皿均应使用塑料或玻璃制品，使用的试管器皿均应在使用前泡酸，并用去离子水冲洗干净，干燥后使用。样品消化时注意酸不要烧干，以免发生危险。

二、滴定法（EDTA 法）

1. 原理

钙与氨羧络合剂能定量地形成金属络合物，其稳定性较钙与指示剂所形成的络合物为强。在适当的 pH 范围内，以氨羧络合剂 EDTA（乙二胺四乙酸）滴定，在达到定量点时，EDTA 就自指示剂络合物中夺取钙离子，使溶液呈现游离指示剂的颜色（终点）。根据 EDTA 络合剂用量，可计算钙的含量。

2. 仪器

（1）微量滴定管 1～2mL。

（2）碱式滴定管 50mL。

（3）刻度吸管 0.5～1mL。

（4）试管。

3. 试剂

（1）硝酸（G.R），高氯酸（G.R）。

（2）混合酸消化液：硝酸＋高氯酸 按 4＋1 混合。

（3）1.25mol/L KOH 溶液：称取 71.13g 氢氧化钾，用去离子水定容至 1000mL。

（4）10g/L 氰化钠溶液：称取 1.0g 氰化钠，用去离子水定容至 100mL。

（5）0.05 mol/L 柠檬酸钠溶液：称取 14.7g 柠檬酸钠，用去离子水定容至 1000mL。

（6）EDTA 溶液：称取 4.50gEDTA，用去离子水定容至 1000mL。使用时稀释 10 倍即可。

（7）钙红指示剂：称取 0.1g 钙红指示剂，用去离子水使其溶解并定容至 100mL，此指示剂在 4℃ 冰箱中可保存 1 个月。

（8）去离子水：80(kΩ)以上。

以上试剂均需使用优级纯试剂,并于 4℃保存。

(9) 氨羧络合剂为乙二胺四乙酸的二钠盐。

(10) 国家标准物质研究中心提供:钙标准溶液浓度为 1000μg/mL。

(11) 钙标准中间液配制:取 10mL 标准溶液,移入 100 mL 容量瓶中,用去离子水定容至 100mL。

4. 操作步骤

(1) 标定 EDTA 浓度:取 0.5mL 钙标准贮备液,用 EDTA 溶液滴定,标定其 EDTA 的浓度,根据滴定结果计算出每毫升 EDTA 相当于钙的毫克数,即滴定度 T。

(2) 样品及空白滴定:吸取 0.1mL 样品消化液及空白液于试管中,加 1 滴氰化钠溶液和 0.1mL 柠檬酸钠溶液,用滴定管加 1.5mL 氢氧化钾溶液,再加 3 滴钙红指示剂,立即以稀释 10 倍的 EDTA 溶液滴定,直到指示剂由紫变蓝为止。

5. 计算

$$x = \frac{T \times (V - V_0) \times f \times 100}{m}, (\text{mg}/100\text{g})$$

式中 T ——EDTA 滴定度,mg/mL;

V ——滴定样品时所用 EDTA 量,mL;

V_0 ——滴定空白时所用 EDTA 量,mL;

f ——稀释倍数;

m ——取样量,g (固体重量为 g,液体为 mL)。

本方法的检测范围为:5~50μg。

6. 注意事项

样品处理要防止污染,所用器皿均应使用塑料或玻璃制品,使用的试管器皿均应在使用前泡酸,并用去离子水冲洗干净,干燥后使用。样品消化时注意酸不要烧干,以免发生危险。加指示剂后,不要等太久,最好加后立即滴定。加氰化钠和柠檬酸钠目的是除去其他离子的干扰。滴定时的 pH 为 12~14。

第三节 磷的测定方法

1. 原理

食物中的有机物经酸氧化分解,使磷在酸性条件下与钼酸铵结合生成磷钼酸铵。此化合物经对苯二酚、亚硫酸钠还原成蓝色化合物——钼蓝。用分光光度计在波长 660nm 处测定钼蓝的吸光值,以测定磷的含量。反应式为:



$$H_3PO_4 + 12(NH_4)_3MoO_4 + 21HNO_3 \longrightarrow (NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3 + 21NH_4NO_3 + 12H_2O$$

2. 适用范围



依据中华人民共和国国家标准 GB12393—90，此方法适用于所有食品及保健品中磷元素含量的测定。

3．仪器

722 分光光度计。

4．试剂

（1）硝酸（G.R）、高氯酸（G.R），硫酸（A.R）。

（2）混合酸消化液：硝酸＋高氯酸 按 4＋1 混合。

（3）15%（体积分数）硫酸溶液：取 15mL 硫酸缓慢加入到 80mL 水中，并定容至 100mL。

（4）50g/L 钼酸铵溶液：取 5g 钼酸铵，用 15%硫酸溶液稀释至 100mL。

（5）对苯二酚溶液：取 0.5g 对苯二酚于 100mL 水中，溶解后加一滴浓硫酸。

（6）200g/L 亚硫酸钠溶液[注意：此溶液需在每次实验前临时配制]：称取一定量的亚硫酸钠，用蒸馏水溶解即可。

（7）标准质控物：猪肝粉（国家标准物质研究中心提供），质控物需室温干燥保存。

（8）国家标准物质中心提供：磷标准贮备溶液，浓度为 1000μg/mL。

（9）标准中间液的配制：吸取 1mL 磷标准贮备溶液，然后移入 100mL 容量瓶中，用去离子水定容至 100mL，浓度为 10mg/L。

5．操作步骤

（1）样品消化：实验操作需在无元素污染的环境中进行。准确称取样品干样 0.3～0.7g，湿样 1.0g 左右，饮料等其他液体样品 1.0～2.0g，然后将其放入 50mL 消化管中，加混酸 15mL[注意：油样或含糖量高的食品可多加些酸]，过夜。次日，将消化管放入消化炉中，消化开始时可将温度调低（约 130℃左右），然后逐步将温度调高（最终调至 240℃左右）进行消化，一直消化到样品冒白烟，液体变成无色或黄绿色为止。若样品未消化完全可再加几毫升混酸，直到消化完全。消化完后，待凉，再加 5mL 去离子水，继续加热，直到消化管中的液体约剩 2mL 左右，取下，放凉，然后转移至 10mL 试管中，再用去离子水冲洗消化管 2～3 次，并最终定容至 10mL。

样品进行消化时，应同时做样品空白消化。

（2）磷标准曲线：分别吸取标准贮备液 1.0、3.0、5.0mL 至 20mL 刻度试管中，然后依次加入 2mL 钼酸铵溶液、1mL 亚硫酸钠溶液、1mL 对苯二酚溶液，加蒸馏水定容至 20mL，混匀，静置 30min，在波长 660nm 处测定其吸光度，由此计算出回归系数，利用回归方程计算或绘制成校正曲线。

(3) 测定：取样品及空白液各 2mL 分别至 20mL 试管中，然后依次加入 2mL 钼酸铵溶液、1mL 亚硫酸钠溶液、1mL 对苯二酚溶液，加蒸馏水定容至 20mL，混匀，静置 30min，在波长 660nm 处测定其吸光度，并根据测出的吸光度在标准曲线上算得未知溶液中的磷含量。

6. 计算

$$x = \frac{m_1}{m} \times \frac{V_1}{V_2} \times 100(\text{mg}/100\text{g})$$

式中 x——样品中磷含量，mg/100g；

m_1——由标准曲线及回归方程算得样品测定液中磷含量，mg；

m——称样量，g；

V_1——消化液定容总体积，mL；

V_2——测定用消化液的体积，mL。

此元素最低检出限为 2μg。

7. 注意事项

亚硫酸钠溶液最好每次实验前临时配制，否则可能会使钼蓝溶液发生浑浊。其次定容完后，静置时间不亦过长，否则溶液颜色将会加深，其结果不准确。

第四节 钾、钠的测定方法

1. 原理

每种元素的原子能够吸收特定波长的光能，而吸收的能量值与该光路中该元素的原子数目成正比。用特定波长的光照射这些原子，测量该波长的光被吸收的量，与标准溶液制成的校正曲线对比。求出被测元素的含量。

2. 适用范围

依据中华人民共和国国家标准，钾：GB—1239790，钠：GB—1239790，此方法适用于所有食品及保健品中元素含量的测定。

3. 仪器

原子吸收光谱分光光度计。

4. 试剂

(1) 硝酸(G.R)，高氯酸(G.R)。

(2) 混合酸消化液：硝酸＋高氯酸 按 4＋1 混合。

(3) 去离子水：80(kΩ)以上。

(4) 标准质控物：猪肝粉(国家标准物质研究中心提供)，质控物在室温干燥保存。

(5) 国家标准物质研究中心提供：钾、钠标准贮备溶液，浓度均为1000μg/mL。

(6) 标准中间液浓度均为1000μg/mL。

以上标准溶液需4℃冰箱保存。

5. 操作步骤

(1) 样品消化：实验操作需在无元素污染的环境中进行。准确称取样品干样0.3~0.7g，湿样1.0g左右，饮料等其他液体样品1.0~2.0g，然后将其放入50mL消化管中，加混酸15mL(油样或含糖量高的食品可多加些酸)，过夜。次日，将消化管放入消化炉中，消化开始时可将温度调低(约130℃左右)，然后逐步将温度调高(最终调至240℃左右)进行消化，一直消化到样品冒白烟并变成无色或黄绿色为止。若样品未消化完全可再加几毫升混酸，直到消化完全。消化完后，待凉，再加5mL去离子水，再加热，直到消化管中的液体约剩2mL左右，取下，放凉，然后转移至10mL试管中，再用去离子水冲洗消化管2~3次，并最终定容至10mL，此为试样溶液。

样品进行消化时，应同时进行样品空白消化。

(2) 测定：将标准中间液分别配置成不同浓度系列的标准工作液，然后上机测定(表6-2)。

表6-2 不同浓度系列标准工作液的配制

元素	中间液浓度/(μg/mL)	吸取量/mL	稀释体积/mL	工作液浓度/(μg/mL)	稀释用溶液
K	1000	2.0	100	20.0	去离子水
		4.0		40.0	
		6.0		60.0	
		8.0		80.0	
Na	1000	0.5	100	5.0	
		1.0		10.0	
		2.0		20.0	
		4.0		40.0	

实验条件及方法：钾、钠的测定波长分别404.4、589.0nm，狭缝分别为0.5nm和0.2nm，灯位置及电流按仪器使用说明调至最佳状态，然后点火进行测定，首先，以各标准系列溶液绘制标准曲线，然后逐一测定空白及样品。

6. 计算

根据仪器测定出的数据，代入公式进行计算。

$$x=\frac{(\rho-\rho_0)\times V\times f\times 100}{m\times 1000}(\text{mg}/100\text{g})$$

式中 x——样品中元素的含量，mg/100g；

ρ——试样溶液中元素的浓度 mg/L；

ρ_0——空白值；

V——样品定容体积，mL；

f——稀释倍数；

m——取样量，g（固体质量为 g，液体为 mL）。

钾、钠最低检出限分别为 0.05μg 和 0.3μg。

7. 注意事项

样品处理要防止污染，所用器皿均应使用塑料制品，使用的试管及器皿均应在使用前泡酸，并用去离子水冲洗干净，干燥后使用。样品消化时，注意酸不要烧干，以免发生危险。

第五节　铁、铜、锰、镁、锌的测定方法

原子吸收光谱分析方法是一种应用比较广泛的化学分析方法，主要用来对不同物质中各种微量及常量元素含量的分析，其特点是：精确定量生物样品中的许多种微量元素，包括组织中存在的元素。易操作，对所测定的元素有较高的灵敏度和精确度。且常用于单元素分析。因此，原子吸收是目前用来分析微量元素最常用的方法之一。

1. 原理

每种元素的原子能够吸收特定波长的光能，而吸收的能量值与该光路中该元素的原子数目成正比。用特定波长的光照射这些原子，测量该波长的光被吸收的量，与标准溶液制成的校正曲线对比，求出被测元素的含量。

2. 适用范围

依据中华人民共和国国家标准，铁：GB12396—90，铜：GB/T5009.13—96，锰：GB12396—90，镁：GB12396—90，锌：GB/T5009.14—96。

以上方法适用于所有食品及保健品中元素含量的测定，其元素含量在 1mg/kg 浓度以上。

3. 仪器

原子吸收光谱分光光度计。

4. 试剂

(1) 硝酸(G.R)，高氯酸(G.R)，盐酸(G.R)。

(2) 混合酸消化液：硝酸＋高氯酸 按 4＋1 混合。

(3) 0.5mol/L HNO_3 溶液：取 33mL 硝酸，加去离子水定容至 1000mL。

(4) 0.12mol/L HCl。

(5) 去离子水：80(kΩ)以上。

(6) 标准质控物：猪肝粉(国家标准物质研究中心提供)，质控物需室温干

燥保存。

(7) 国家标准物质研究中心提供标准贮备液：铁标准溶液、铜标准溶液、锰标准溶液、锌标准溶液、镁标准溶液，以上标准液浓度均为 1000μg/mL。

(8) 标准中间液的配制：精确吸取上述标准贮备溶液各 10mL（镁 5mL），分别移入 100 mL 容量瓶中，然后用稀释用溶液定容至 100 mL［注意：铁、铜、锰、镁用 0.5mol/L 硝酸溶液稀释定容，锌用 0.12mol/L 盐酸稀释定容］。

以上各溶液须放在聚乙烯瓶内，4℃冰箱保存。

5. 操作步骤

(1) 样品消化：实验操作需在无元素污染的环境中进行。准确称取样品干样 0.3～0.7g，湿样 1.0g 左右，饮料等其他液体样品 1.0～2.0g，然后将其放入 50mL 消化管中，加混合酸 15mL［注意：油样或含糖量高的食品可多加些酸］，过夜。次日，将消化管放人消化炉中，消化开始时可将温度调低（约 130℃左右），然后逐步将温度调高（最终调至 240℃左右）进行消化，一直消化到样品冒白烟，液体变成无色或黄绿色为止。若样品未消化好可再加几毫升混酸，直到消化完全。消化完后，待凉，加 5mL 去离子水，继续加热，直到消化管中的液体约剩 2mL 左右，取下，放凉，然后转移至 10mL 试管中，再用去离子水冲洗消化管 2～3 次，并最终定容至 10mL，此为试样溶液。

样品进行消化时，应同时做样品空白消化。

(2) 测定：将标准贮备液分别配置成不同浓度的标准工作液，以供上机使用（表 6－3）。

表 6－3　　不同浓度系列标准工作液的配制

元素	中间液浓度/(μg/mL)	吸取量/mL	稀释体积/mL	工作液浓度/(μg/mL)	稀释用溶液
Fe	100	0.5 1.0 2.0 4.0	100	0.5 1.0 2.0 4.0	0.5mol/L HNO_3 溶液
Cu	100	0.1 0.2 0.3 0.4	100	0.1 0.2 0.3 0.4	
Mn	100	0.5 1.0 2.0 3.0	100	0.5 1.0 2.0 3.0	
Mg	50	0.1 0.3 0 4 0.5	50	0.1 0.3 0.4 0.5	

续表

元素	中间液浓度/(μg/mL)	吸取量/mL	稀释体积/mL	工作液浓度/(μg/mL)	稀释用溶液
Zn	100	0.2 0.4 0.8 1.0	100	0.2 0.4 0.8 1.0	0.12mol/L HCl 溶液

实验条件及方法：测定铁、铜、锰、镁、锌元素的波长分别为 248.3、324.8、279.5、285.2nm 和 213.9nm，仪器狭缝分别为 0.2、0.5、0.2、0.5nm 和 1.0nm，灯位置、灯电流等均按仪器使用说明调制至最佳状态，然后点火准备测定。首先，应以各标准系列溶液绘制标准曲线，然后逐一测定空白及样品。

6. 计算

根据仪器测定出的数据，代入公式进行计算：

$$X=\frac{(\rho-\rho_0)\times V\times f\times 100}{m\times 1000}(\mathrm{mg/100g})$$

式中 x——样品中元素的含量，mg/100g；

ρ——试样溶液中元素的浓度，mg/L；

ρ_0——空白值；

V——样品定容体积，mL；

f——稀释倍数；

m——取样量(固体重量为 g，液体为 mL)。

以上元素最低检出限分别为铁 0.2μg/mL，锰 0.1μg/mL，铜 0.0016μg/mL，锌 0.4μg/mL，镁 0.05μg/mL。

7. 注意事项

样品处理要防止污染，所用器皿均应使用塑料或玻璃制品，使用的试管及器皿均应在使用前泡酸，并用去离子水冲洗干净，干燥后使用。样品消化时注意酸不要烧干，以免发生危险。

第六节 食物中硒的测定(荧光法)

硒是人体必需微量元素之一，其测定方法有荧光法，中子活化法，原子荧光光度法，氢化物原子吸收光度法及比色法等。荧光法是采用比较多的方法，因为方法简单，准确度及灵敏度均较高，易于推广应用。本方法是测定食物中微量元素硒的国家标准方法。

1. 原理

样品经混合酸消化后，硒化合物被氧化为四价无机硒(Se^{4+})，与 2,3－二氨

基萘(2,3－diaminonaphthalene,简称为DAN)反应生成具有荧光的4,5－苯丙苤硒脑(4,5－benzo piaselennol),其荧光强度与硒的浓度在一定的条件下成正比。用环已烷萃取后于激发光波长376nm、发射光波长520nm处测定荧光强度与绘制的标准曲线比较定量。本方法检出限为3ng。

2. 适用范围

依据GB/T 12399—1996食物中硒的测定方法。适用于各类食物中硒的测定。

3. 仪器和设备

(1) 实验室常用设备。

(2) 荧光分光光度计。

4. 试剂

除说明外均为分析纯。实验用水为去离子水。

(1) 环已烷。

(2) 硝酸。

(3) 过氯酸。

(4) 盐酸。

(5) 氢溴酸。

(6) (1+9)盐酸溶液。

(7) (1+1)氨水。

(8) (5+95)去硒硫酸：

① 去硒硫酸：取200mL硫酸,加于200mL水中,再加30mL氢溴酸,混匀,置砂浴上加热蒸去硒与水至出现浓白烟,此时体积应为200mL。

② 取5mL去硒硫酸,加入95mL水中。

(9) 0.2mol/L EDTA溶液：将37g EDTA二钠盐,加水并加热溶解,冷却后稀释至500mL。

(10) 10%盐酸羟胺：称取10g盐酸羟胺溶于水中,稀释至100mL。

(11) 混合酸：硝酸+过氯酸(2+1)。

(12) 0.1% 2,3－二氨基萘(即DAN试剂)(纯度为95%～98%)：需在暗室配制,称取200mg DAN于一带盖三角瓶中,加入200mL 0.1mol/L盐酸,振摇约15min,使其全部溶解,约加40mL环已烷,继续振摇5min,将此液体转入分液漏斗中,待溶液分层后,弃去环已烷层,收集DAN层溶液。如此用环已烷纯化DAN直至环已烷中的荧光数值降至最低时为止[注意：纯化次数视DAN纯度不同而定,一般约需纯化3～4次]。将提纯后的DAN溶液贮于棕色瓶中,约加1cm厚的环已烷覆盖溶液表面。置冰箱中保存。必要时再纯化一次。

(13) 硒标准溶液：

① 硒标准贮备液(100μg/mL)：精确称取100.0mg元素硒(光谱纯)，溶于少量硝酸中，加2mL过氯酸，置沸水浴中加热3～4h，冷却后加入8.4mL盐酸，再置沸水浴中煮2min。准确稀释至1000mL，其盐酸浓度为0.1mol/L。此贮备液浓度为100μg/mL。

② 硒标准使用液(0.05μg/mL)：将①液用0.1mol/L HCl稀释，使含硒为0.05μg/mL。于冰箱中保存。

(14) 0.02%甲酚红指示剂：称取50mg甲酚红溶于水中，加(1+1)氨水1滴，待甲酚红完全溶解后加水稀释至250mL。

(15) EDTA混合液：取0.2mol/L的EDTA(9)和10%盐酸羟氨(10)液各50mL，混匀，再加5mL(14)溶液，用水稀释至1L。

5. 操作步骤

(1) 样品处理及消化：

① 粮食：样品用水洗3次，于60℃烘干，用不锈钢磨磨成粉，贮于塑料瓶内，放一小包樟脑精，盖紧盖保存，备用。

② 蔬菜及其他植物性食物：取可食部分用水冲洗3次后用纱布吸去水滴，用不锈钢刀切碎，取混合均匀的样品于60℃烘干，称重，粉碎，备用。

③ 称取0.5～2.0g样品(含硒量0.01～0.5μg)于磨口三角瓶内，加10mL(5+95)去硒硫酸，样品润湿后，再加20mL混合酸液放置过夜。次日于砂浴上逐渐加热，当激烈反应后(溶液变无色)，继续加热至产生白烟，溶液逐渐变成淡黄色即达到终点。某些蔬菜样品消化后常出现浑浊，难以确定终点，所以要细心观察。另外，含硒较高的蔬菜含有较多的Se^{6+}，需要在消化达到终点时冷却后加10mL(1+9)盐酸，继续加热，使Se^{6+}还原成Se^{4+}。同样按上述方法确定终点。

(2) 测定：于样品消化液中加20mL EDTA混合液，用氨水(1+1)或盐酸调至淡红橙色(pH 1.5～2.0)。以下步骤在暗室进行：加3mL DAN试剂，混匀，置沸水浴中煮5min，取出立即冷却，加3mL环己烷，振摇4min，将全部溶液移入分液漏斗，待分层后弃去水层，环己烷层转入带盖试管中，小心勿使环己烷中混入水滴，于激发光波长376nm，发射光波长520nm处测定4,5－苯丙苤硒脑的荧光强度。

(3) 硒标准曲线绘制：准确吸取硒标准使用液0、0.2、1.0、2.0mL及4.0mL加水至5mL，按样品测定步骤同时进行。硒含量在0.5μg以下时荧光强度与硒含量呈线性关系，在常规测定样品时，每次需做试剂空白与样品硒含量相近的标准管(双份)即可。

6. 计算

$$x = \frac{C - B}{A - B} \times m_1 \times \frac{1}{m_2}$$

式中 x——样品中硒含量,$\mu g/g$;

A——标准管荧光读数;

B——空白管荧光读数;

C——样品管荧光读数;

m_1——标准管中硒质量,μg;

m_2——试样质量,g。

7. 注意事项

(1) 结果的允许差:同一实验室平行测定或重复测定结果相对偏差绝对值≤10%。

(2) 硒含量在0.5μg以下荧光强度与硒含量呈线性关系,超过0.5μg时为非线性关系,故硒含量应控制在0.5μg以内。硒含量过高时要先用环己烷稀释,再测定荧光。

(3) 我国高硒地区食物样品中的硒,多以Se^{6+}形式存在,故应在消化到终点后,加(1+9)HCl还原继续消化至终点使其Se^{6+}转变为Se^{4+}后再测定。

第七节 食物中铅的测定方法(石墨炉原子吸收光谱法)

铅是一种有代表性的重金属和环境化学污染物。食品中铅的污染主要来源有:食品加工、贮存、运输过程中使用的含铅器皿的污染,例如铅合金、搪瓷、陶瓷以及马口铁食具的焊锡、锡酒壶等;工业"三废"的排放,污染区附近生长的农作物,大气中的铅尘、废气、受铅污染的水源、剥落的油漆都可以直接或间接污染食品;目前在我国很多地方仍在使用含铅的汽油也是铅污染环境及农作物的一个主要来源。

铅是一种具有蓄积性、多亲和性的毒物,对各器官、组织都有毒性作用,主要损害神经系统、造血系统、消化系统和肾脏,还损害人体的免疫系统,使机体抵抗力下降,铅对婴幼儿和学龄前儿童是易感人群。对于一般人群,人体内的铅主要来自食物,也还有饮水、空气等其他途径的来源,儿童还可以通过吃非食品物件而接触铅。预防铅对人体产生危害的重要措施是控制人们从饮食中铅的摄入量,因而监测食品中铅的含量及制定各类食品中铅的允许限量十分重要。

目前食品中铅的测定方法很多,比较普遍应用的主要方法有石墨炉原子吸收光谱法、火焰原子吸收光谱法、双硫腙比色法、氢化物原子荧光光谱法、示波极谱法、电感耦合等离子体光谱法和电感耦合等离子体质谱法等。其中石墨炉原子吸收光谱法是目前国际上通用的方法,被大多数国家所采用。该种方法灵敏度高、样品前处理简单方便、性价比好。在食品及商检系统被广泛应用。而火焰

原子吸收光谱法、双硫腙比色法、示波极谱法方法繁杂、样品分析用时长，不是灵敏度不高，就是难于掌握，目前很少使用。氢化物原子荧光光谱法灵敏度高，但并不是铅的特异性高的方法；电感耦合等离子体光谱法使用方便，但仪器昂贵，对于食品中铅及其他重金属的分析灵敏度达不到要求，故很少使用。电感耦合等离子体质谱法是目前最灵敏的方法，但前处理要求严格，仪器昂贵，适用于标准物质定值和标准方法考核。本书主要介绍石墨炉原子吸收光谱法。

1. 原理

样品经灰化或酸消解后，样液注入原子吸收分光光度计石墨炉中原子化，铅原子吸收 283.3nm 共振线，在一定浓度范围，其吸收值与铅含量成正比，可与标准系列比较定量。

2. 试剂

实验用水为亚沸蒸馏水或电阻率 80 万 Ω 以上的去离子水。所有试剂要求使用优级纯或处理后不含铅的试剂。

(1) 过硫酸铵。

(2) 过氧化氢(30%)。

(3) 高氯酸、硝酸。

(4) HNO_3 溶液(1+1)。

(5) HNO_3 溶液(0.5moL/L)：取 3.2mL 硝酸，加入水中稀释至 100mL.

(6) HNO_3 溶液(1.0mol/L)：取 6.4mL 硝酸，加入水中稀释至 100mL.

(7) 磷酸氢二铵溶液 (20g/L)：取 2.0g 特纯磷酸氢二铵溶于双蒸水中定容至 100mL。

(8) 混合酸：硝酸+高氯酸 (4+1)。

(9) 铅标准溶液(自己配制或由国家标准局标准物质研究中心购买铅标准溶液)。

① 铅标准贮备液：精密称取 1.000g 金属铅 (99.99%) 分次加少量硝酸 (1+1) 加热溶解，总量不超过 37mL，移入 1000mL 容量瓶，加水至刻度。此溶液每毫升含 1.0mg 铅。

② 铅标准贮备液：精密称取 0.1598g 硝酸铅(优级纯)，加 10mL 1.0mol/L HNO_3，全部溶解后，移入 100mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，此溶液每毫升相当于 1.0mg 铅。

③ 铅标准使用液：火焰法铅标准使用液浓度为 10μg/mL (用亚沸蒸馏水逐级稀释)；石墨炉法铅标准使用液浓度为 100ng/mL，用 0.5mol/L HNO_3 逐级稀释。

3. 仪器

（1）原子吸收分光光度计（附石墨炉及铅空心阴极灯）。

（2）所用玻璃仪器均需以硝酸（1+5）浸泡过夜，用水反复冲洗，最后用去离子水冲洗干净。

（3）马福炉或恒温干燥箱。

（4）瓷坩埚或压力消化器。

（5）微波消解装置。

4．操作方法

（1）样品预处理：采样和制备过程中，应注意不使样品污染。粮食、豆类去壳去杂物后，磨碎过20目筛，贮于塑料瓶中，保存备用。蔬菜、水果洗净，晾干，取可食部分捣碎备用。鱼、肉等用水洗净，取可食部分捣碎，备用。

（2）样品消解（根据实验条件可任选一方法）：

① 干灰化法：称取1.00～5.00g样品（根据铅含量而定）于瓷坩埚中，先小火炭化至无烟，移入马福炉（500±25）℃灰化6～8h，放冷。若个别样品不彻底，则加1mL混合酸在小火上加热，反复多次直到消化完全，放冷，用硝酸（0.5 mol/L）将灰分溶解，少量多次地过滤于10～25mL容量瓶中。并定容至刻度，摇匀备用，同时作试剂空白。

② 过硫酸铵法：称取样品1.00～5.00g于瓷坩埚中，加2～4mL硝酸浸泡1h以上，炭化，取下加2～3g过硫酸铵盖于上面，继续炭化至不冒烟，转入马福炉，500℃恒温2h，再升至800℃，保持20min，冷却，加1.0mol/L硝酸溶液，少量多次溶解灰分，并定量移入10mL容量瓶中，定容至刻度，混匀备用。同时作试剂空白。

③ 压力消解罐法：称取0.200～2.000g样品［注意：粮食、豆类干样不得超过1g，蔬菜、水果、动物性样品控制在2g以内，水分大的样品称样后先蒸水分至近干］于聚四氟乙烯罐内，加硝酸2～4mL过夜。再加过氧化氢2～3mL［注意：总量不能超过内罐容积的1/3］。盖好内盖，旋紧外盖，放入恒温箱，120℃保温3～4h，自然冷却。将消化液定量转移至10mL（或25mL）容量瓶中。用少量水洗涤内罐，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀。同时做试剂空白。

④ 湿法消解：称取样品1.000～5.000g于三角烧瓶中，放数粒玻璃珠，加10mL混合酸（或再加1～2mL硝酸），加盖过夜，加一小漏斗在电炉上消解，若变棕黑色，再加混合酸。直至冒白烟，消化液无色透明，放冷移入10～25mL容量瓶，用水定容至刻度，摇匀。同时做试剂空白。

⑤ 微波消解法：精密称取0.3000～0.5000g于微波消化罐中，加1.0mol/L HNO_3 4mL，盖好内盖，旋紧外盖，放入微波消解装置，按照预先设定的程序（见表6-4）进行升温消化，待消化完毕后，取出消化罐，将消化液定量移入10.0mL

或25.0mL比色管中，用双蒸水少量多次洗罐，稀释至刻度，混匀，即供试样液。同样做试剂空白液。

表 6－4　　微波消化升温程序

步　骤	1	2	3	4	5
平均功率占总功率的百分比/%	100	100	100	100	100
压力/psi	20	40	85	135	175
升压时间/min	10	10	10	10	10
保压时间/min	5	5	5	5	5
排风量/%	100	100	100	100	100

注：1psi＝6.89kPa(psi：即 lb/in^2，是进口仪器常用非法定压力单位，为便于使用，本方法不再换算成法定压力单位)。

(3) 测定：

① 仪器参考条件：波长283.3nm；狭缝0.2～1.0nm；灯电流5～7mA；干燥温度85℃，5s；120℃，30s；灰化温度450℃，15～20s；原子化温度1700～2300℃，4～5s，背景校正为氘灯或塞曼效应扣背景。

② 标准曲线绘制：将仪器参考仪器条件调至最佳状态。待稳定后分别吸取上面配制的铅标准使用0.010，0.020，0.030，0.040，0.050μg/mL各10～20μL，或由仪器自动配制后注入石墨炉，同时吸取20g/L磷酸氢二铵溶液5.0μL，进样总体积20～30.0μL，注入石墨炉，在调整好的仪器条件下测定。测得其吸光值，并求得吸光值与浓度关系的一元线性回归方程，或由仪器自动计算出标准曲线测定结果。

③ 样品测定：将试剂空白液和样液分别吸10～20μL，或由仪器自动配制后注入石墨炉，同时吸取20g/L磷酸氢二铵溶液5.0μL，进样总体积20～30.0μL，注入石墨炉，在调整好的仪器条件下测定。测得其吸光值，代入标准系列的一元线性回归方程中求得样液中铅含量，或由仪器自动计算出样品含量结果。

5. 计算

$$x=\frac{(\rho_1-\rho_2)\times V\times 1000}{m_1\times 1000}$$

式中　x——样品中铅含量，μg/kg（或μg/L）；

ρ_1——测定样液中铅含量，μg/L；

ρ_2——空白液中铅含量，μg/L；

m_1——样品质量或体积，g（mL）；

V——样品定容总体积，mL。

[注意：石墨炉原子吸收测定结果以浓度单位表示，如 ρ_1 和 ρ_2 的单位，样品浓度与进样量无关]

6. 注意事项

（1）允许差：相对相差≤20%。

（2）微波消解或高压消解——石墨炉原子吸收法测定食品中的铅，经多个实验室验证，方法简便、快速，经标准参考物质核对，测得结果与保证值无显著性差异。

（3）微波消解或高压消解样品具有用酸量少、防污染及损失的优点。操作时应按规定使用，注意样品取样量不可超过规定，严格控制加热温度。

（4）石墨炉原子吸收光度法测定食品中的微量元素具有高灵敏度的特点，但原子吸收光谱的背景干扰是个复杂问题，除使用仪器本身的特殊装置，例如连续光源背景校正器、氘灯扣背景及塞曼效应背景校正技术外，选用合适的基体改进剂十分重要，我们经过多年实验经验认为磷酸氢二铵作为基体改进剂对于改善样品基体，增加灵敏度具有不可替代的作用。对复杂的样品应注意使用标准参考物质核对结果，避免产生背景干扰。

第八节　食物中汞的测定方法

汞以各种化学形态排入环境，污染空气、水质和土壤，导致对食品的污染，被污染的鱼贝类是人类食物中汞的主要来源，通过食物链的富集，使鱼能富集在水体中的汞达数十万倍以上。鱼体中的汞主要以甲基汞的形式存在，其所占比例为鱼体总汞含量的80%～100%。

汞的毒性与汞的化学存在形式、汞化合物的吸收有很大的关系。无机汞不容易吸收，毒性小，而有机汞特别是烷基汞，容易吸收，毒性大，尤其是甲基汞，90%～100%被吸收。微量的汞在人体不致引起危害，可经尿、粪和汗液等途径排出体外，如摄入量超过一定量，尤其是甲基汞是属于蓄积性毒物，在体内蓄积到一定量时，将损害人体健康。根据日本熊本和新泻水俣病患者所摄入有毒鱼贝的汞浓度和估计摄入量，推算出体内100mg的蓄积量为中毒剂量。甲基汞还可通过胎盘进入胎儿体内，危害下一代。

食品一旦被汞污染，难以彻底除净，无论使用碾磨加工或用不同的烹调方法，如：烘、炒、蒸或煮都无济于事。试验证明，用冷冻、盐腌、蒸煮、油炸、干燥等方法均无法将鱼体的甲基汞去掉。据调查，吃含汞5～6mg/kg的粮食，半个月后，即可发生中毒，即使吃0.2～0.3mg/kg的含汞粮，半年左右也可发生中毒，可见控制粮食中的含汞量十分重要。

冷原子吸收光谱法是目前被广泛应用的方法，它适用于各类食品中总汞的测定。

1．原理

样品经过硝酸－硫酸、硝酸－硫酸－五氧化二钒或硝酸－过氧化氢高压消

解，使样品中的汞转为离子状态，在强酸性中以氯化亚锡为还原剂，将离子状态的汞定量的还原为汞原子。在常温下易蒸发为汞原子蒸气，以氮气或干燥清洁空气为载气，将汞吹出。而汞原子对波长253.7nm的共振线具有强烈的吸收作用，在一定浓度范围其吸收大小与汞原子浓度的关系符合比尔定律，与标准系列比较定量。最低检出浓度为0.11～0.30ng/mL，最低检出量为0.002mg/kg。

2. 试剂

除特别注明外，本标准所用试剂均为分析纯试剂，水均为去离子水。

玻璃对汞有吸附作用，因此测汞所用一切器皿需用硝酸溶液(1+3)浸泡，洗净后备用。

(1) 硝酸(优极纯)。

(2) 硫酸(优极纯)。

(3) 30%过氧化氢。

(4) 300g/L氯化亚锡溶液：称取30g氯化亚锡($SnCl_2 \cdot 2H_2O$)，加少量水，再加2mL硫酸使溶解后，加水稀释至100mL，放置冰箱保存。

(5) 变色硅胶：干燥用。

(6) 硫酸+硝酸+水混合酸液(1+1+8)：量取10mL硫酸，再加入10mL硝酸，慢慢倒入80mL水中，混匀后冷却。

(7) 五氧化二钒。

(8) 50g/L高锰酸钾溶液：配好后煮沸10min，静置过夜，过滤，贮于棕色瓶中。

(9) 200g/L盐酸羟胺溶液。

(10) 汞标准贮备溶液：精密称取0.1354g于干燥器干燥过的二氯化汞，加混合酸(1+1+8)溶解后移入100mL容量瓶中，并稀释至刻度，混匀，此溶液每毫升相当于1mg汞[注意：① 为了避免在配制稀汞标准溶液时玻璃对汞的吸附，最好先在容量瓶内加进部分底液，再加入汞贮备液。② 为保证汞贮备液稳定性，通常在溶液中加少量重铬酸钾。配制方法：取0.5g重铬酸钾，用水溶解，加50mL优极纯硝酸，加水至1L。用此保存液来配制汞标准贮备溶液(1mL含10μg汞)可保存2年不变，若配制汞标准应用液(1mL含0.1μg汞)，置于冰箱中保存10d不变]。

(11) 标准使用液：吸取1.0mL汞标准溶液，置于100mL容量瓶中，加混合酸(1+1+8)稀释至刻度，此溶液每毫升相当于10μg汞。再吸取此液1.0mL，置于100mL容量瓶中，加混合酸(1+1+8)稀释至刻度，此溶液每毫升相当于0.1μg汞，临用时现配。

3. 仪器

(1) 消化装置。

(2) 压力消解器(或压力消解罐或压力溶弹)100mL容量。

（3）微波消解装置。

（4）测汞仪

（5）汞蒸气发生器或25mL布氏吸收管代替。

4．操作步骤

实验前先做试剂空白实验，检查所用试剂、实验用水及器皿是否符合要求，如空白值过高，实验用水、试剂须提高纯度，仪器再次清洗，必要时用稀硝酸煮沸热洗。

（1）样品消化。

① 回流消化法：

a．粮食或水分少的食品：称取10.00g样品，置于消化装置锥形瓶中，加玻璃珠数粒，加45mL硝酸、10mL硫酸，转动锥形瓶，防止局部炭化。装上冷凝管后，小火加热，待开始发泡即停止加热，发泡停止后，加热回流2h。如加热过程中溶液变棕色，再加5mL硝酸，继续回流2h，放冷后从冷凝管上端小心加20mL水，继续加热回流10min，放冷，用适量水冲洗冷凝管，洗液并入消化液中，将消化液经玻璃棉过滤于100mL容量瓶内，用少量水洗锥形瓶、滤器，洗液并入容量瓶内，加水至刻度，混匀。取与消化样品相同量的硝酸、硫酸，按同一方法做试剂空白试验，待测。

b．植物油及动物油脂：称取5.0g样品，置于消化装置锥形瓶中，加玻璃珠数粒，加入7mL硫酸，小心混匀至溶液颜色变为棕色，然后加40mL硝酸，装上冷凝管后，以下按①a．自“小火加热”起依法操作［注意：含油脂较多的食品，消化时易发泡外溅，可在消化前在样品中先加少量硫酸，变成棕色（轻微炭化），然后加硝酸可减轻发泡外溅现象，但避免严重炭化］。

c．薯类、豆制品：称取20.00g捣碎混匀的样品（薯类须预先洗净晾干），置于消化装置锥形瓶中，加玻璃珠数粒及30mL硝酸、5mL硫酸，转动锥形瓶，防止局部炭化。装上冷凝管后，以下按①a．自“小火加热”起依法操作。

d．肉、蛋类：称取10.00g捣碎混匀的样品，置于消化装置锥形瓶中，加玻璃珠数粒及30mL硝酸、5mL硫酸，转动锥形瓶，防止局部炭化。装上冷凝管后，以下按①a．自“小火加热”起依法操作。

e．牛奶及乳制品：称取20.00g牛奶或酸牛奶，或相当于20.00g牛奶的乳制品（2.4g全脂奶粉，8g甜炼乳，5g淡炼乳），置于消化装置锥形瓶中，加玻璃珠数粒及30mL硝酸，牛奶或酸牛奶加10mL硫酸，乳制品加5mL硫酸，转动锥形瓶，防止局部炭化。装上冷凝管后，以下按①a．自“小火加热”起依法操作［注意：在消化过程中，由于残余在消化液中的氮氧化物对测定有严重干扰，使结果偏高。尤其硝酸—硫酸回流法，硝酸用量大，消化后需加水继续加热回流10min，使剩余二氧化氮排出，消解液趁热进行吹气驱赶液面上的氮氧化物，冷却后滤去样品中蜡质等不易消化物质，避免干扰］。

② 五氧化二钒消化法：本法适用于水产品、蔬菜、水果中总汞的测定。

取可食部分，洗净，晾干，切碎，混匀。取 2.50g 水产品或 10.00g 蔬菜、水果，置于 50～100mL 锥形瓶中，加 50mg 五氧化二钒粉末，再加 8mL 硝酸，振摇，放置 4h，加 5mL 硫酸，混匀，然后移至 140℃ 砂浴上加热，开始作用较猛烈，以后渐渐缓慢，待瓶口基本上无棕色气体逸出时，用少量水清洗瓶口，再加热 5min，放冷，加 5mL 50g/L 高锰酸钾溶液，放置 4h(或过夜)，滴加 200g/L 盐酸羟胺溶液使紫色退去，振摇，放置数分钟，移入容量瓶中，并稀释至刻度。蔬菜、水果为 25mL，水产品为 100mL。待测。

取与消化样品相同量的五氧化二钒、硝酸、硫酸，按同一方法进行试剂空白试验。

③ 高压消解法：本方法适用于粮食、豆类、蔬菜、水果、瘦肉类、鱼类、蛋类及乳与乳制品类食品中总汞的测定。

a. 粮食及豆类等干样：称取 1.00g 经粉碎混合均匀后过 40 目筛孔的样品，置于聚四氟乙烯塑料内罐内，加 5mL 硝酸放置过夜，再加 3mL 过氧化氢，盖上内盖放入不锈钢外套中，将不锈钢外盖和外套旋紧密封，然后将消解器放入普通干燥箱(烘箱)隔板上，关好箱门，通电加热，温升至 120℃ 后保持恒温 2～3h，至消解完成，关断电源，自然冷至室温，开启消解罐，将消解液用玻璃棉过滤至 25mL 容量瓶中，用少量去离子水淋洗内罐，经玻璃棉滤入容量瓶内，定容至 25mL，摇匀。同时做试剂空白试验，待测。

b. 蔬菜、瘦肉、鱼类及蛋类水分含量高的鲜样：将鲜样用捣碎机打成匀浆，称取匀浆 3.00g 置于聚四氟乙烯塑料罐内，加盖留缝，于 65℃ 烘箱中鼓风干燥或一般烘箱至近干，取出，加 5mL 硝酸放置过夜，以下按③a. 自"再加 3mL 过氧化氢"起依法操作。

④ 微波消解法：称取 0.10～0.50g 样品于消解罐中，加入 1～5mL 硝酸、1～2mL 过氧化氢，盖好安全阀后，将消解罐放入微波炉消解系统中，按照预先设定的程序(表 6－5)进行升温消化，至消解完全，冷却后用硝酸溶液(1＋9)定

表 6－5 微波消化升温程序

步骤	1	2	3	4	5
部分功率占总功率的百分比/%	100	100	100	100	100
压力/psi	20	40	85	135	175
升压时间/min	10	10	10	10	10
保压时间/min	5	5	5	5	5
排风量/%	100	100	100	100	100

注：1psi＝6.89kPa(psi：即 lb/in^2，是进口仪器常用非法定压力单位，为便于使用，本方法不再换算成法定压力单位)。

量转移并定容至25mL(低含量样品可定容至10mL),混匀待测。

(2) 测定：按仪器要求调整好,备用[注意：测汞仪中的光道管、气路管道均要保持干燥、光亮、平滑、无水气凝集,否则应分段拆下,用无汞水煮,再烘干备用。

从汞蒸气发生瓶至测汞仪的连接管道不宜过长,宜用不吸附汞的氯乙烯塑料管。测定时应注意水气的干扰,从汞蒸气发生器产生的汞原子蒸气,通常带有水气,进仪器前如不经干燥,会被带进光道管,产生汞吸附,降低检测灵敏度。因此通常汞原子蒸气必须先经干燥管吸水后再进入仪器检测。常用的干燥剂以变色硅胶为好,当干燥管硅胶吸水变色后,提示需更换干燥剂,以保证仪器光道管的干燥]。

① 吸取10.0mL样品消化液,置于汞蒸气发生器内,连接抽气装置,沿壁迅速加入1mL 300g/L氯化亚锡溶液,立即通入流速为1.5L/min的氮气或经活性炭处理的空气,使汞蒸气经过硅胶干燥管进入测汞仪中,读取测汞仪上最大读数,同时做试剂空白试验。

② 标准曲线的绘制：吸取0.00、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50mL汞标准使用液(相当0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05μg汞),置于试管中,各加3.4mol/L混合酸至10mL,以下按①自“置于汞蒸气发生器内”起依法操作,绘制标准曲线。

③ 五氧化二钒消化法标准曲线的绘制：吸取0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL汞标准使用液(相当0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5μg汞),置于6个50mL容量瓶中,各加1mL硫酸(1+1)、1mL 50g/L高锰酸钾溶液,加20mL水,混匀,滴加(200g/L)盐酸羟胺溶液使紫色退去,加水至刻度混匀,分别吸取10.00mL(相当0.00、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10μg汞),以下按①自“置于汞蒸气发生器内”起依法操作,绘制标准曲线。

5. 计算

$$x=\frac{(m_1-m_2)\times 1000}{m\times V_2/V_1\times 1000}$$

式中 x——样品中汞的含量,mg/kg或mg/L;

m_1——测定用样品消化液中汞的质量,μg;

m_2——试剂空白液中汞的质量,μg;

m——样品的质量或体积,g或mL;

V_1——样品消化液总体积,mL;

V_2——测定用样品消化液体积,mL。

6. 注意事项

(1) 本方法在不同实验室分别应用F_{732}-G、F_{732}-S、CG-1型、590型测汞仪及WFX-1F_2冷原子吸收方式进行验证,最低检出浓度为0.11～0.30 ng/mL,标准曲线相关系数范围为0.9994～0.9999;在各类食品中的回收率为90.1%～102.2%,油样回收偏低;相对标准偏差为9.5%～12.2%;用标准参考样品NBS1570核对结果的准确性,在5个实验室进行准确度试验均获得好的结果。

(2) 用五氧化二钒消解可直接在50～100mL锥形瓶中进行，不需要回流装置，适宜大批样品的消解，如在锥形瓶口加一个长颈漏斗效果更好(回流作用)。但注意不能加热时间过长，更不能烧干，如能按照上述条件控制，用五氧化二钒消解与回流法消解，经统计 t 检验，二者无显著差别。

高压消解法消化样品具有快速、简便、防污染的特点。但使用高压消解器时必须按使用说明操作，应注意控温、消解器内罐容量和取样量等方面。为了防止在消解反应中产生过高的压力，将样品先冷消化放置过夜是必需的。

微波消解法是目前汞测定中消化样品的最佳方法，它具有消解时间最短，污染可能性最小，方法简便安全的优点。如果条件允许，推荐使用此方法。

第九节　食物中砷的测定方法

元素砷在自然环境中极少，因其不溶于水，故无毒，但极易被氧化为剧毒的三氧化二砷(即砒霜)。砷的化合物在自然环境中广泛存在。对食品的污染常见有：含砷农药的使用，如砷酸铅、砷酸钙、亚砷酸钠和三氧化二砷等，应用这些农药喷洒作物距收获期太近，就会残留较多的含砷农药；食品加工时，当使用一些含砷的化学物质作原料，如硫酸、盐酸、葡萄糖、食用色素或其他添加剂时，由于原料污染了砷，使所加工的食品也受到不同程度的污染；环境砷污染也会造成对食品的污染，如砷矿的开采和熔炼、各种混杂砷的有色金属的熔炼、含砷农药的生产和用砷化物作原料的玻璃(脱色)、皮毛(脱色)、木材(防腐)、颜料(巴黎绿)、制药等工矿企业排出的工业“三废”，常含有大量的砷，含砷的“三废”向环境排放，引起食品污染。尤其是水生生物、海洋甲壳纲动物对砷有很强的浓集作用，可浓缩水体中的砷高达3300倍。在各种食品中，发现海产食品中总砷含量高，但主要是低毒的有机砷，剧毒的无机砷含量较低。

由于仪器条件的限制，砷的测定方法有很多种。在日常工作中，如果仅作为卫生学指标中含量范围的测定，则砷斑法简单，易行。银盐法操作复杂，灵敏度低，不适用于大批样品的测定。如果条件许可，氢化物原子荧光法灵敏度高，操作相对简单，适用于日常大批样品的测定工作。而在本书参考方法中提到的氢化物发生原子吸收分光光度法，只需在火焰原子吸收的基础上配备氢化物发生石英管，也不失为良好的砷的检测方法。

一、银　盐　法

1．原理

样品经消化后，以碘化钾、氯化亚锡将高价砷还原为三价砷，然后与锌粒和

酸产生的新生态氢生成砷化氢，经银盐溶液吸收后，形成红色胶态物，在 510nm 处比色，与标准系列比较定量。最低检出量为 0.2mg/kg。

2. 适用范围

标准方法(GB/T5009.11—1996)，本标准适用于各类食品中总砷的测定。

3. 试剂

除另有规定，所用的试剂为分析纯试剂，水为蒸馏水或同等纯度水。

(1) 硝酸。

(2) 硫酸。

(3) 盐酸。

(4) 硝酸＋高氯酸混合液(4＋1)：量取 80mL 硝酸，加 20mL 高氯酸，混匀。

(5) 硝酸镁溶液(150g/L)：称取 15g 硝酸镁[$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$]溶于水中，并稀释至 100mL。

(6) 氧化镁，氯化镍，硝酸镁。

(7) 碘化钾溶液(150g/L)：称取 15g 碘化钾溶于水中，并稀释至 100mL，贮于棕色瓶中。

(8) 酸性氯化亚锡溶液：称取 40.0g 氯化亚锡($SnCl_2 \cdot 2H_2O$)，加盐酸溶解并稀释至 100.0mL，加入数颗金属锡粒[注意：氯化亚锡($SnCl_2$)又称二氯化锡，白色或半透明晶体，带二个分子结晶水($SnCl_2 \cdot 2H_2O$)的是无色针状或片状晶体，溶于水、乙醇和乙醚。氯化亚锡试剂不稳定，在空气中被氧化成不溶性氯氧化物，失去还原作用，为了保持试剂具有稳定的还原性，在配制时，加盐酸溶解为酸性氯化亚锡溶液，并加入数粒金属锡粒，使其持续反应生成氯化亚锡及新生态氢，使溶液具有还原性。

氯化亚锡在本实验的作用为将 As^{5+} 还原为 As^{3+}；在锌粒表面沉积锡层以抑制产生氢气作用过猛]。

(9) 盐酸溶液(1＋1)：量取 50mL 盐酸，小心倒入 50mL 水中，混匀。

(10) 乙酸铅溶液(100g/L)。

(11) 乙酸铅棉花：用 100g/L 乙酸铅溶液浸透脱脂棉后，压除多余溶液，并使疏松，在 100℃ 以下干燥后，贮存于玻璃瓶中[注意：乙酸铅棉花塞入导气管中，是为吸收可能产生的硫化氢，使其生成硫化铅而滞留在棉花上，以免吸收液吸收产生干扰，硫化物和银离子生成灰黑色的硫化银，但乙酸铅棉花要塞得不松不紧为宜]。

(12) 无砷锌粒[注意：不同形状和规格的无砷锌粒，因其表面积不同，与酸反应的速度就不同，这样生成的氢气气体流速不同，将直接影响吸收效率和测定结果。一般认为蜂窝状锌粒 3g，或大颗粒锌粒 5g 均可获得良好结果。也有人认为大小颗粒的锌粒混合使用则效果满意。一般确定标准曲线与试样均用同一规格的锌粒为宜]。

(13) 氢氧化钠溶液(200g/L)。

(14) 硫酸溶液(6＋94)：量取 6.0mL 硫酸，小心倒入 94mL 水中，混匀。

(15) 二乙氨基二硫代甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷溶液：称取0.25g二乙氨基二硫代甲酸银[$(C_2H_5)_2NCS_2Ag$]置于乳钵中，加少量三氯甲烷研磨，移入100mL量筒中，加入1.8mL三乙醇胺，再用三氯甲烷分次洗涤乳钵，洗液一并移入量筒中，再用三氯甲烷稀释至100.0mL，放置过夜。滤入棕色瓶中保存[注意：二乙氨基二硫代甲酸银(silver diethyl dithio carbamate)，或称二乙基二硫代氨基甲酸银盐(diethyl dithio carbamic acid, Ag salt)，$(C_2H_5)_2NC(S)SAg$，相对分子质量256.15，为黄色粉末，不溶于水而溶于三氯甲烷，性质极不稳定，遇光或热，易生成银的氧化物而呈灰色，因而配置浓度不易控制。若市售品不适用，实验室也可自行制备。

二乙氨基二硫代甲酸银制备法：分别溶解1.7g硝酸银、2.3g二乙氨基二硫代甲酸钠(DDCNa，铜试剂)于100mL蒸馏水中，冷却到20℃以下，缓缓搅拌混合，过滤生成的柠檬黄色银盐(AgDDC)沉淀，用冷蒸馏水洗涤沉淀数次，在干燥器中干燥，避光保存备用。

吸收液中AgDDC浓度以0.2%～0.25%为宜，浓度过低将影响测定的灵敏度及重现性，因此，配置试剂时，应放置过夜或在水浴上微热助溶。轻微的混浊可以过滤除去。若试剂溶解度不好时，应重新配制，吸收液必须澄清]。

(16) 砷标准贮备溶液：精密称取0.1320g在硫酸干燥器中干燥过的或在100℃干燥2h的三氧化二砷，加5mL 200g/L氢氧化钠溶液，溶解后加25mL硫酸(6+94)溶液，移入1000mL容量瓶中，加新煮沸冷却的水稀释至刻度，贮存于棕色玻璃塞瓶中。此溶液每毫升相当于0.10mg砷。

(17) 砷标准使用液：吸取1.0mL砷标准溶液，置于100mL容量瓶中，加1mL硫酸(6+94)溶液，加水稀释至刻度，此溶液每毫升相当于1.0μg砷。

(18) 银盐溶液。

(19) 三氯甲烷。

4. 仪器

(1) 分光光度计。

(2) 测砷装置：见图6-1。

① 100～150mL锥形瓶：19号标准口。

② 导气管：管口19号标准口或经碱处理后洗净的橡皮塞与锥形瓶密合时不应漏气。管的另一端管径1.0mm。

③ 吸收管：10mL刻度离心管作吸收管用。

5. 操作步骤

(1) 样品消化：

① 硝酸-高氯酸-硫酸法：

a. 粮食、粉丝、粉条、豆干制品、糕点、茶叶等及其他含水分少的固体食品：称取5.00g或10.00g的粉碎样品，置于250～500mL定氮瓶中，先加水少许使湿润，加数粒玻璃珠，10～15mL硝酸-高氯酸混合液，放置片刻，小火缓缓加热，待作用缓和，放冷。沿瓶壁加入5mL或10mL硫酸，再加热，至瓶中液体开



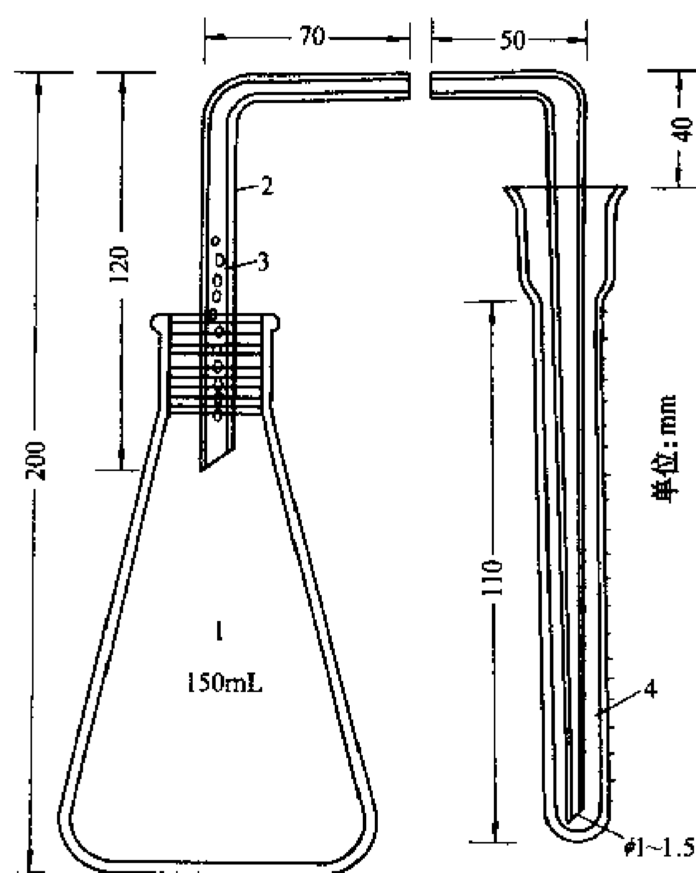


图 6-1　测砷装置图
1—150mL 锥形瓶　2—导气管　3—乙酸铅棉花
4—10mL 刻度离心管

始变成棕色时，不断沿瓶壁滴加硝酸－高氯酸混合液至有机质完全分解。加大火力，至产生白烟，溶液应澄明无色或微带黄色，放冷。在操作过程中应注意防止爆炸。

加 20mL 水煮沸，除去残余的硝酸至产生白烟为止，如此处理 2 次，放冷。将冷后的溶液移入 50mL 或 100mL 容量瓶中，用水洗涤定氮瓶，洗涤液并入容量瓶中，放冷，加水至刻度，混匀。定容后的溶液每 10mL 相当于 1g 样品，相当加入硫酸量 1mL[注意：样品消化液中残余的硝酸需如法驱尽，硝酸的存在影响反应与显色，会导致结果偏低，必要时需增加测定用硫酸的加入量]。

取与消化样品相同量的硝酸－高氯酸混合液和硫酸，按同一方法做试剂空白实验。

b. 蔬菜、水果：称取 25.00g 或 50.00g 洗净打成匀浆的样品，置于 250～500mL 定氮瓶中，加数粒玻璃珠，10～15mL 硝酸－高氯酸混合液，以下按粮食等样品自“放置片刻”起依法操作，但定容后的溶液每 10mL 相当于 5g 样品，相当加入硫酸量 1mL。

c. 酱、酱油、醋、冷饮、豆腐、腐乳、酱腌菜等：称取 10.00g 或 20.00g 样品

(或吸取 10.00mL 或 20.00mL 液体样品),置于 250～500mL 定氮瓶中,加数粒玻璃珠,5～15mL 硝酸－高氯酸混合液,以下按粮食等样品自"放置片刻"起依法操作,但定容后的溶液每 10mL 相当于 2g 样品或 2mL 样品。

d. 含酒精性饮料或含二氧化碳饮料：吸取 10.00mL 或 20.00mL 样品,置于 250～500mL 定氮瓶中,加数粒玻璃珠,先用小火加热除去乙醇或二氧化碳,再加 5～10mL 硝酸－高氯酸混合液,混匀后,以下按粮食等样品自"放置片刻"起依法操作,但定容后的溶液每 10mL 相当于 2mL 样品。

吸取 5～10mL 水代替样品,加与消化液相同量的硝酸－高氯酸混合液和硫酸。按相同操作方法做试剂空白实验。

e. 含糖量高的食品：称取 5.00g 或 10.00g 的粉碎样品,置于 250～500mL 定氮瓶中,先加水少许使湿润,加数粒玻璃珠,10～15mL 硝酸－高氯酸混合后,摇匀。缓缓加入 5mL 或者 10mL 硫酸,待作用缓和停止起泡沫后,再加大火力,至有机质分解完全,发生白烟,溶液应澄明无色或微带黄色,放冷。以下按粮食等样品自"加 20mL 水煮沸"起依法操作。

f. 水产品：取可食部分样品捣成匀浆,称取 5.00g 或 10.00g[注意：海产藻类、贝类可适当减少取样量],置于 250～500mL 定氮瓶中,加数粒玻璃珠,10～15mL 硝酸－高氯酸混合后,以下按粮食等样品自"沿瓶壁加入 5mL 或 10mL 硫酸"起依法操作。

② 硝酸－硫酸法：以硝酸代替硝酸－高氯酸混合液进行操作。

③ 灰化法：粮食、茶叶及其他含水分少的食品：称取 5.00g 磨碎样品,置于坩埚中,加入 1g 氧化镁,1mL 氯化镍及 10mL 硝酸镁溶液,混匀,浸泡 4h。于低温或置水浴锅上蒸干。用小火炭化至无烟后移入马福炉中加热至 550℃,灼烧 3～4h,冷却后取出。

加 5mL 水湿润灰分后,用细玻棒搅拌,再用少量水洗下玻棒上附着的灰分至坩埚内。放置水浴上蒸干后移入高温炉 550℃ 灰化 2h,冷却后取出。

加 5mL 水湿润灰分,再慢慢加入 10mL 盐酸溶液(1＋1),然后将溶液移入 50mL 容量瓶中。坩埚用盐酸溶液(1＋1)洗涤 3 次,每次 5mL,再用水洗涤 3 次,每次 5mL,洗涤液均并入容量瓶中,再加水至刻度,混匀。定容后的溶液每 10mL 相当于 1g 样品,相当于加入盐酸量(中和需要量除外)1.5mL。全量供银盐法测定时,不必再加盐酸。

取于灰化样品相同量的氧化镁和硝酸镁溶液,按同一操作方法作试剂空白试验。

植物油：称取 5.00g 样品,置于 50mL 瓷坩埚中,加 10g 硝酸镁,再在上面覆盖 2g 氧化镁,将坩埚置小火上加热,至刚冒烟,立即将坩埚取下,以防内容物溢出,待烟小后,再加热至炭化完全。将坩埚移至马福炉中,550℃ 以下灼烧至灰

化完全，冷却取出。

加5mL水湿润灰分，再缓缓加入15mL盐酸溶液（1+1），然后将溶液移入50mL容量瓶中。坩埚用盐酸溶液（1+1）洗涤5次，每次5mL，洗涤液均并入容量瓶中，加盐酸（1+1）至刻度，混匀。定容后的溶液每10mL相当于1g样品，相当于加入盐酸量（中和需要量除外）1.5mL。

取于消化样品相同量的氧化镁和硝酸镁，按同一操作方法作试剂空白试验。

水产品：取可食部分样品捣成匀浆，称取5.00g置于坩埚中，加1g氧化镁及10mL硝酸镁溶液，混匀，浸泡4h。以下按灰化法中粮食等样品自"于低温或置水浴锅上蒸干"起依法操作。

（2）测定

① 用硝酸-高氯酸-硫酸或硝酸-硫酸消化液：吸取一定量的消化后的定容溶液（相当于5g样品）及同量的试剂空白液，分别置于150mL锥形瓶中，补加硫酸至总量为5mL，加水至50～55mL。

吸取0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0mL砷标准使用液（相当于0、2、4、6、8、10μg砷）分别置于150mL锥形瓶中，加水至40mL，再加10mL硫酸（1+1）。

于样品消化液，试剂空白液及砷标准溶液中各加3mL 150g/L碘化钾溶液，0.5mL酸性氯化亚锡溶液，混匀，静置15min。各加入3g无砷锌粒，立即分别塞上装有乙酸铅棉花的导气管，并使管尖端插入盛有4mL银盐溶液的离心管中的液面下，在常温下反应45min后，取下离心管，加三氯甲烷补足4mL。用1cm比色杯，以零管调节零点，于波长520nm处测吸光度，绘制标准曲线比较［注意：砷化氢发生及吸收应防止在阳光直射下进行，同时应控制温度在25℃左右，温度过高反应快，吸收不彻底，过低则反应时间延长，作用时间以1h为宜，夏季可缩短为45min。室温高时三氯甲烷部分挥散，在比色前用三氯甲烷补足4mL，并不影响结果。吸收液中含有水分时，当吸收与比色环境的温度改变，会引起轻微浑浊，比色时可微温使其澄清］。

② 用灰化法消化液：取灰化法消化液及试剂空白液，分别置于150mL锥形瓶中。吸取0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0mL砷标准使用液（相当于0、2、4、6、8、10μg砷）分别置于150mL锥形瓶中，加水至43.5mL，再加6.5mL盐酸。以下按自"于样品消化液"起依法操作。

6．计算

$$x=\frac{(m_1-m_2)\times 1000}{m\times V_2/V_1\times 1000}$$

式中　x——样品中砷的含量，mg/kg或mg/L；

m_1——测定用样品消化液中砷的含量，μg；

m_2——试剂空白液中砷的含量，μg；

m——样品质量（体积），g（mL）；

V_1——样品消化液的总体积,mL;

V_2——测定用样品消化液的体积,mL。

二、氢化物原子荧光光度法

1. 原理

食品样品经湿消解或干灰化后,加入硫脲使五价砷还原为三价砷,再加入硼氢化钠或硼氢化钾使还原生成砷化氢,由氩气载入石英原子化器中分解为原子态砷,在特制砷空心阴极灯的发射光激发下产生原子荧光,其荧光强度在固定条件下与被测液中的砷浓度成正比,与标准系列比较定量。

2. 试剂

本方法所用试剂均为分析纯以上试剂,测定用水为去离子水或同等程度的水。

(1) NaOH 溶液(2g/L)。

(2) 硼氢化钠($NaBH_4$)溶液(10g/L):称取硼氢化钠 10.0g,溶于 2g/L 氢氧化钠溶液 1000mL 中,混匀。此溶液于冰箱中可保存 10d,取出后应当日使用[注意:也可称取 14g 硼氢化钾代替 10g 硼氢化钠]。

(3) 硫脲溶液(50g/L)。

(4) 硫酸溶液(1+9):量取硫酸 100mL,小心倒入 900mL 水中,混匀。

(5) 氢氧化钠溶液(100g/L)[注意:供配制砷标液用,少量即够]。

(6) 砷标准溶液:

砷标准贮备液:含砷 0.1mg/mL。精密称取于 100℃干燥 2h 以上的三氧化二砷(As_2O_3)0.1320g,加 100g/L 氢氧化钠 10mL 溶解,用水定量转入 1000mL 容量瓶中,加硫酸(1+9)25mL,定容至刻度。

砷标准使用液:含砷 1μg/mL。吸取 1.00mL 砷标准贮备液于 100mL 容量瓶中,用水稀释至刻度。此液应当日配制使用。

(7) 湿消解试剂:硝酸、硫酸、高氯酸。

(8) 干灰化试剂:六水硝酸镁(150g/L)、氧化镁、盐酸(1+1)。

3. 仪器

XDY、AFS 或 VI 系列氢化物原子荧光光度计。

4. 操作步骤

(1) 样品消解:

湿消解:固体样品称样 1～2.5g,液体样品称样 5～10g(或 mL)(精确至小数点后第二位),置于 50～100mL 锥形烧瓶中,同时做 2 份试剂空白。加硝酸 20～40mL,硫酸 1.25mL,摇匀后放置过夜,置于电热板上加热消解。若消解液

处理至 10mL 左右时仍有未分解物质或色泽变深，稍冷，补加硝酸 5～10mL，再消解至 10mL 左右观察，如此重复两三次，注意避免炭化。如仍不能消解完全，则加入高氯酸 1～2mL，继续加热至消解完全后，再持续蒸发至高氯酸的白烟散尽，硫酸的白烟开始冒出，冷却，加水 25mL，再蒸发至冒硫酸白烟。冷却，用水将内容物定量转入 25mL 容量瓶或比色管中，其间加入 50g/L 硫脲 2.5mL，补水至刻度并混匀，备测。干灰化：一般应用于固体样品。称取 1～2.5g（精确至小数点后第 2 位）于 50～100mL 坩埚中，同时做 2 份试剂空白。加 150g/L 硝酸镁 10mL 混匀，低热蒸干，将氧化镁 1g 仔细覆盖在干渣上，于电炉上炭化至无黑烟，移入 550℃ 马福炉灰化 4h。取出放冷，小心加入盐酸（1＋1）10mL 以中和氧化镁并溶解灰分，转入 25mL 容量瓶或比色管，向容量瓶或比色管中加入 50g/L 硫脲 2.5mL，另用硫酸（1＋9）12.5mL 分次涮洗坩埚后转出合并，直至 25mL 刻度，混匀备测。

（2）标准系列制备：取 25mL 容量瓶或比色管 6 支，依次准确加入 1μg/mL 砷标准使用液 0.00、0.05、0.20、0.50、2.00、5.00mL（各相当于砷浓度 0、2、8、20、80、200ng/mL），各加硫酸（1＋9）12.5mL、50g/L 硫脲 2.5mL，补加水至刻度，混匀备测。

（3）测定：仪器参考条件：光电倍增管电压：400V；砷空心阴极灯电流：35mA；原子化器：温度 820～850℃；高度 7mm；氩气流速：载气 600mL/min；屏蔽气 800mL/min；测量方式：荧光强度或浓度直读；读数方式：峰面积；读数延迟时间：1s；读数时间：15s；硼氢化钠溶液加入时间：5s；标液或标样加入体积：2mL。

浓度方式测量：如直接测荧光强度，则在开机并设定好仪器条件后，预热稳定约 20min。按“B”键进入空白值测量状态，连续用标准系列的 0 管进样，待读数稳定后，按空挡键寄存下空白值（即让仪器自动扣底）即可开始测量。先依次测标准系列（可不再测 0 管），标列测完后应仔细清洗进样器（或更换一支），并再用 0 管测试使读数基本回零后，才能测试剂空白和样品，每测不同的样品前都应清洗进样器。记录（或打印）下测量数据。

仪器自动方式：利用仪器提供的软件功能可进行浓度直读测定，为此在开机、设定条件和预热后，还需输入必要的参数，即样品量（g 或 mL），稀释体积（mL），进样体积（mL），结果的浓度单位，标准系列各点的重复测量次数、标准系列的点数（不计零点）及各点的浓度值。首先进入空白值的测量状态，连续用标列的 0 管进样以获得稳定的空白值并执行自动扣底后，再依次测标列（此时 0 管需再测一次）。在测样液前，需再次进入空白值测量状态，先用标列 0 管测试使读数复原并稳定后，再用两个试剂空白各进一次样，让仪器取其均值作为扣底的

空白值，随后即可依次测样品。测定完毕后退回主菜单，选择“打印报告”即可将测定结果打出。

5．计算

如果采用荧光强度测量方式，则需先对标准系列的结果进行回归运算(由于测量时0管强制为0，故零点值应该输入以占据一个点位)，然后根据回归方程求出试剂空白液和样品被测液的砷浓度，再按下式计算样品的砷含量：

$$x=\frac{(\rho-\rho_0)\times 25}{m\times 1000}$$

式中 x—样品的砷含量，mg/kg(或mg/L)；

ρ—样品被测液的浓度，ng/mL；

ρ_0—试剂空白液的浓度，ng/mL；

m—样品的量，g(或mL)。

6．注意事项

(1) 线性范围和相关系数：标准曲线的线性范围为0～200ng/mL，在此范围内相关系数>0.9990。如果采用仪器软件提供的二三次曲线回归功能，则量程范围还可扩大1个数量级。

检出限：本方法的检出限为2ng/mL砷(按低浓度测量时的3倍标准差计算)，若取样量以5g(mL)计，则对样品的最低测定浓度为0.01mg/kg(或mg/L)。

精密度：湿消解法重复测定的相对标准偏差<10%；干灰化法重复测定的相对标准偏差<15%。

准确度：湿消解法测定的回收率为90%～105%；干灰化法测定的回收率为85%～100%。

(2) 砷的氢化和原子化机理：

① 在酸性环境中，硫脲使五价砷还原为三价砷，自身被氧化为甲脒化二硫。

② 硼氢化钠(或钾)与酸作用生成大量新生态氢。

③ 三价砷再被新生态氢还原为气态的砷化氢逸出。

④ 砷化氢被氩气和反应中产生的氢气载入石英管炉中，受热后即分解为原子态砷，在砷灯发射光的激发下产生原子荧光。

(3) 试剂及其浓度和用量：

① 硼氢化钠的浓度：硼氢化钠的水溶液不太稳定，浓度越稀越不稳定，必须加入氢氧化钠以提高其稳定性；但氢氧化钠又不能加得太多，否则会剧烈降低反应时的酸度。采用进口试剂按本方法配制，保存于冰箱中2周内效果不变。国产试剂纯度较低，稳定性也较差。

② 硼氢化钠的用量：在本仪器上硼氢化钠溶液的用量是通过加液时间来

控制的,经实测,在仪器上流速约为 0.3mL/s。实验证明,硼氢化钠溶液的用量对测定灵敏度有显著影响,当用量少时,由于还原力弱,灵敏度就低;当用量过多时,由于发生大量氢气产生稀释作用,灵敏度也降低。最优的用量是与具体的反应条件(硼氢化钠的浓度和碱度、样液的加入体积和酸度)密切相关的。在本方法条件下,10g/L 的硼氢化钠加液时间为 5s(约 1.5mL)效果最好。

③ 硫酸的用量:在生成砷化氢的反应中酸性介质可用硫酸、盐酸或其他酸,由于在样品消解时要加入硫酸,故本方法采用硫酸作介质。在实验所得的荧光强度－硫酸浓度曲线上,荧光强度起初随着酸度的增加而急剧增大,继之由于氢气的稀释作用而逐渐减小,约在硫酸(1+49)酸度时达到平台区。考虑到硼氢化钠溶液的流速以及消解后硫酸的剩余量可能出现的变异,本方法中硫酸的用量选择了相当于平台区中部硫酸浓度(1+19)的量。

④ 硫脲的影响:实验证明单用硼氢化钠不能将五价砷定量的还原为砷化氢,此时还原率只有 70%～80%;而加入硫脲预还原后反应便能达到完全,由于样品经消解后绝大部分砷以被氧化为五价,所以加入硫脲是必须的。

(4) 样品消解:

① 湿消解:对于很多加酸后反应剧烈的样品,应该冷处理较长时间(或过夜),以防止产生大量泡沫造成损失。必须避免消解液炭化,因碳可能把砷还原为元素态而造成大量损失。消解液中加入的酸(主要是硝酸)是造成空白值的主要因素,如果不同的样品消耗的酸量差异大,其空白值差异也大,此时应做各自的试剂空白。

② 干灰化:硝酸镁在灼烧时放出氧,起着促进灰化的作用。150g/L 硝酸镁溶液 10mL 分解后生成氧化镁 0.23g,加上加入的氧化镁共 1.23g,以后恰能被盐酸(1+1)10mL 中和。氧化镁除了保温传热以外,更起着防止砷挥发损失的作用,因为灼烧中升华出的三氧化二砷能被它固定下来。因此在灰化前,应将氧化镁粉末仔细覆盖在全部样品干渣的表面。

③ 干扰:在研究对砷测定的干扰时,考虑了 a.能生成氢化物的元素,b.在食品中经常存在的元素,因此选择了锑、铅、锡、铜、锌五种进行试验。当加入一定浓度倍数的试验离子后使结果偏离在 ±10% 以上时,即判为有干扰。结果如下:锑,6 倍以下无干扰;铅,20 倍以下无干扰;锡,30 倍以下无干扰;铜,200 倍以下无干扰;锌,200 倍以下无干扰。

三、氢化物发生原子吸收光谱法

1. 原理

样品经湿消化处理后,加入还原剂使五价砷还原为三价砷,再加入硼氢化钠

或硼氢化钾还原生成砷化氢，由氩气载入火焰原子化器中分解为原子态砷蒸气吸收波长 193.7nm 的共振线，其吸收量与砷含量成正比，与其标准系列比较定量。

2. 试剂

实验用水为石英亚沸高纯水或电阻率 80 万 Ω 以上的去离子水。所有试剂要求使用优级纯或更高级别试剂。

所用硝酸，BV－I 级硝酸和 MOS 级盐酸均购自北京化学试剂研究所。

(1) 氢氧化钠溶液(2g/L)。

(2) 硼氢化钠($NaBH_4$)溶液(10g/L)：称取硼氢化钠 10.0g，溶于 2g/L 氢氧化钠溶液 1000mL 中，混匀。此溶液于冰箱中可保存 10d，取出后应当日使用。(也可称取 14g 硼氢化钾代替 10g 硼氢化钠)。

(3) 10%碘化钾溶液：取 10g 碘化钾溶于 100.0mL 双蒸水中。

(4) 盐酸溶液(1+1)：量取盐酸 100mL，小心倒入 100mL 水中，混匀。

(5) 20%盐酸羟铵溶液：取 20g 盐酸羟铵溶于 100.0mL 双蒸水中。

(6) 砷标准溶液：

①砷标准贮备液：砷标准溶液 1000.0mg/L(购于国家标准物质中心)。

②砷标准中间液：将砷标准贮备液以 0.5mol/L 盐酸逐级稀释至 100.0μg/L。

③砷标准使用液：吸取 0.50、1.25、2.50、3.75mL 砷标准贮备液于 25.0mL 容量瓶中，加入 2.5mL10%碘化钾溶液或 10%硫脲溶液，用盐酸(1+1)溶液稀释至刻度。此液应当日配制使用。

(7) 硝酸溶液(70+30)：取 70mL 硝酸加入 30mL 双蒸水中。

(8) 硝酸+高氯酸混合液(4+1)：量取 80mL 硝酸，加 20mL 高氯酸，混匀。

(9) 10%硫脲溶液：取 10g 硫脲溶于 100.0mL 双蒸水中。

3. 仪器

(1) 仪器：Varian AA——200 型火焰原子吸收分光光度计(附氢化物发生装置及砷空心阴极灯)。

(2) 微波样品消解装置：MDS——2000 型(美国 CEM 公司)。

(3) 所用玻璃仪器均需以硝酸 (1+5) 浸泡过夜，用水反复冲洗，然后用蒸馏水 3 次冲洗。并用 1mol/L 乙二氨基四乙酸二钠盐浸泡过夜，用水反复冲洗，最后用石英亚沸高纯水冲洗 3 次，备用。

(4) 仪器条件：见表 6－6。

4. 操作步骤

(1) 样品处理：



表 6-6 仪器参数

元 素	波长/nm	灯电流/mA	延迟时间/s
As	193.7	8	30

① 样品预处理：采样和制备过程中，应注意不使样品污染。植物性中药材去杂物后，取样品于60℃干燥4h，磨碎过20目筛，储于塑料瓶中.保存备用。

② 微波消解：精密称取0.2000～0.5000g样品于微波消化罐中，加10mol/L硝酸4.0mL，盖好内盖，旋紧外盖，放入微波消解装置，按照预先设定的程序(见表6-7)进行升温消化，待消化完毕后，取出消化罐，将消化液定量移入10.0mL或25.0mL比色管中，用双蒸水少量多次洗罐，稀释至刻度，混匀，即供试样液。同样做试剂空白液。

取10mL比色管，依次准确加入1.0 mL上述样液，先加入少许盐酸(1+1)溶液，再加入1.0mL10%碘化钾溶液，1.0mL 20%盐酸羟胺溶液，用盐酸(1+1)溶液稀释至刻度，混匀备测。

表 6-7 微波消化升温程序

步 骤	1	2	3	4	5
部分功率占总功率的百分比/%	100	100	100	100	100
压力/psi	20	40	85	135	175
升压时间/min	10	10	10	10	10
保压时间/min	5	5	5	5	5
排风量/%	100	100	100	100	100

注：1psi＝6.89kPa(psi：即1b/in²，是进口仪器常用非法定压力单位，为便于使用，本方法不再换算成法定压力单位)。

③ 硝酸-高氯酸湿消化：精密称取0.5000～1.0000g样品于消化瓶中，加入硝酸-高氯酸溶液15.0mL，同时做2份试剂空白，混匀，放置过夜。置于程序电热板上加热消解，缓慢加热，若消解液处理至10mL左右时仍有未分解物质或色泽变深，稍冷，补加硝酸5～10mL，再消解至10mL左右观察，如此重复两三次，注意避免炭化。如仍不能消解完全，则加入高氯酸1～2mL，继续加热至消解完全后，再持续蒸发至高氯酸的白烟散尽，冷却，加水5mL，再蒸发至冒硝酸白烟。冷却，用水将内容物定量转入10mL比色管中，其间加入10%硫脲1.0mL，补水至刻度并混匀，备测[注意：硝酸-高氯酸消化的样品不能用碘化钾作为还原剂，因为其与高氯酸反应生成高氯酸钾的乳白色沉淀，影响测定。所以用硫脲作为还原剂]。

(2) 测定：在调整好的仪器条件下，将标准溶液，空白液，样品溶液分别导入置于火焰上的石英池中原子化进行测定。每做一批样品，同时测定标准参考物质中砷元素的含量。

5．计算

$$x=\frac{(\rho_1-\rho_2)\times V}{m\times 1000}$$

式中 x——样品中砷含量，mg/kg（或 mg/L）；

ρ_1——测定样液中砷含量，μg/L；

ρ_2——空白液中砷含量，μg/L；

m——样品质量或体积，g（mL）；

V——样品定容总体积，mL。

本方法为本实验室建立的方法。

第十节 食物中氟的测定方法

氟与人体健康的关系密切，是参与人体正常代谢的一个微量元素，每天约需3～4.5mg，机体摄人氟不足，则可促进龋齿的形成；摄入适量的氟有利于牙齿的健康。但若长期摄入过量的氟，则对骨骼、肾脏、甲状腺和神经系统造成损害，严重者可形成氟骨症，使人丧失劳动力。一般食品中均含有微量氟，主要富集在动物骨骼及植物叶片中，由于工业"三废"的排放、含氟农药的使用及地质因素，常可使食品污染氟。近年来，由于食品氟含量过高造成的慢性氟中毒症已有报道。因此，确定食品中氟的有效测定方法，加强食品中氟的检测是十分必要的。

目前，国内外报道了很多种食品中氟含量的测定方法，我国国标中的扩散－比色法灵敏度高，但实际操作复杂，需用试剂多，速度慢，并不适应对常规食品中氟含量进行检测。而本文所提到的扩散－电极法，具有操作简单，所用试剂少，速度快的优点，尤其适用于大批样品的测定。

一、扩散-氟试剂比色法

1．原理

食品中氟化物在扩散盒内与酸作用，产生氟化氢气体，经扩散被氢氧化钠吸收。氟离子与镧、氟试剂（茜素氨羧络合剂）在适宜 pH 下生成蓝色三元络合物，颜色随氟离子浓度的增加而加深，用或不用含胺类有机溶剂提取，与标准系列比较定量。用含胺类有机试剂提取为单色法，其灵敏度较高，最低检出量为0.1mg/kg；不用含胺类有机试剂提取为复色法，操作简便，最低检出量为0.2mg/kg。

2．试剂

本方法所用水均为不含氟的去离子水，所用试剂均为分析纯试剂，全部试剂

贮于聚乙烯塑料瓶中。

(1) 20g/L 硫酸银－硫酸溶液：称取 2g 硫酸银，溶于硫酸(3+1)溶液中并稀释至 100mL，混匀。

(2) 40g/L 氢氧化钠－乙醇溶液：取 4g 氢氧化钠，溶于乙醇并稀释至 100mL。

(3) 1mol/L 乙酸：取 3mL 冰乙酸，加水稀释至 50mL。

(4) 茜素氨羧络合剂溶液：称取 0.19g 茜素氨羧络合剂，加少量水及 40g/L 氢氧化钠溶液使其溶解，加 0.125g 乙酸钠，用 1mol/L 乙酸调节 pH 为 5.0(红色)，加水稀释至 500mL，置冰箱内保存。

(5) 250g/L 乙酸钠溶液。

(6) 硝酸镧溶液：称取 0.22g 硝酸镧，用少量 1mol/L 乙酸溶解，加水至约 450mL，用 250g/L 乙酸钠溶液调节 pH 为 5.0，加水稀释至 500mL，置冰箱内保存。

(7) 缓冲液(pH4.7)：称取 30g 无水乙酸钠，溶于 400mL 水中，加 22mL 冰乙酸，再缓缓加冰乙酸调节 pH 为 4.7，然后加水稀释至 500mL。

(8) 丙酮。

(9) 二乙基苯胺＋异戊醇溶液(5＋100)：量取 25mL 二乙基苯胺，溶于 500mL 异戊醇中。

(10) 100g/L 硝酸镁溶液。

(11) 40g/L 氢氧化钠溶液：称取 4g 氢氧化钠，溶于水并稀释至 100mL。

(12) 氟标准溶液：精密称取 0.2210g 经 100℃ 干燥 4h 冷的氟化钠，溶于水，移入 100mL 容量瓶中，加水至刻度，混匀，置冰箱中保存。此溶液每毫升相当于 10mg 氟。

(13) 氟标准使用液：吸取 1.0mL 氟标准溶液，置于 200mL 容量瓶中，加水至刻度，混匀。此溶液每毫升相当于 5μg 氟。

(14) 圆滤纸片：剪内径 4.5cm 圆滤纸片，浸于 40g/L 氢氧化钠－乙醇液中，取出于 60℃ 烘干，备用。

3. 仪器

(1) 塑料扩散盒：内径 4.5cm，深 2cm，盖内壁顶部光滑，并带有突起的圈(盛放氢氧化钠吸收液用)，盖紧后不漏气。其他类型塑料盖亦可使用。

(2) 恒温箱：(55±1)℃。

(3) 分光光度计。

(4) 酸度计：pHS—2 型或其他型号。

(5) 灰化炉。

4．操作方法

（1）扩散单色法：

① 样品处理：

a．谷类样品：稻谷要去壳，其他粮食要除去可见杂质，取有代表性样品50～100g，粉碎，过40目筛。

b．蔬菜、水果：取可食部分，洗净、晾干、切碎、混匀，称取100～200g样品，80℃鼓风干燥，粉碎，过40目筛。结果以鲜样表示，同时要测水分。

c．特殊样品（含脂肪高、不易粉碎过筛的样品，如花生、肥肉。含糖分高的果实等）：称取研碎的样品1.00g，于坩埚（镍、银、瓷等）内，加4mL100g/L硝酸镁溶液，加40g/L氢氧化钠溶液使呈碱性，混匀后浸泡0.5h，将样品中的氟固定，然后在水浴上挥干，再加热炭化至不冒烟，再于600℃马福炉内灰化6h，待灰化完全，取出放冷，取灰分进行扩散［注意：样品灰化时，要注意马福炉和试剂是否含微量氟。氟是最活泼的非金属元素，在自然界普遍存在，在马福炉的耐火砖中往往含有微量氟，在高温下释放出的氟有可能污染样品。纯度差的试剂也可能含微量氟，因此做试剂空白试验是必要的，避免由于污染出现假阳性］。

② 测定：取塑料盒若干个，分别于盒盖中央加0.2mL 40g/L氢氧化钠乙醇溶液，在圈内均匀涂布，于55℃恒温箱中烘干，形成一层薄膜，取出备用，或把滤纸片贴于盒盖内。

称取1.0g处理后样品于塑料盒内，加4mL水，使样品均匀分布，不能结块。加4mL 20g/L硫酸银－硫酸溶液，立即盖紧，轻轻摇匀。如样品经灰化处理，则先将灰分全部移入塑料盒内，用4mL水分数次将坩埚洗净，洗液均倒入塑料盒内，并使灰分均匀分散，如坩埚还未完全洗净，可加4mL20g/L硫酸银－硫酸溶液于坩埚内连续洗涤，将洗液倒入塑料盒内，立即盖紧，轻轻摇匀，样品在扩散时，首先要检查所用的扩散盒是否漏气，气密性不好的扩散盒不宜使用。在扩散时，样品加酸后要立即盖紧轻轻摇匀，切勿将盒中的酸溅到盖上。置（55±1）℃恒温箱内保温20h［注意：氟试剂比色法，Al^{3+}、Fe^{3+}、Pb^{2+}、Cu^{2+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}等金属离子和有机酸干扰测定，扩散法使氟离子与试样分离有效的去除干扰。大量的氯化物对扩散和测定有干扰，加入硫酸银使其固定去除干扰］。

将盒取出，取下盒盖，分别用20mL水，少量多次地将盒盖内氢氧化钠薄膜溶解，用滴管小心完全地移入100mL分液漏斗中。

分别于分液漏斗中加3.0mL茜素氨羧络合剂溶液、3.0mL缓冲液、8.0mL丙酮、3.0mL硝酸镧溶液，13.0mL水，混匀，放置10min。各加入10.0mL二乙基胺－异戊醇溶液（5+100），振摇2min，待分层后，弃去水层，分出有机层，并用滤纸过滤于10mL带塞比色管中。

用1cm比色杯于580nm波长处以零管调节零点，测吸光度绘制标准曲线



比较。

(2) 扩散复色法：

① 样品处理：

同①。

② 测定：自"取塑料盒若干个分别于盒盖中央加 0.2mL 氢氧化钠－无水乙醇溶液(40g/L),在圈内均匀涂布,置于(55±1)℃恒温箱内保温 20h",同(1)②。

将盒取出,取下盒盖,分别用 10mL 水分次将盒盖内的氢氧化钠薄膜溶解,用滴管小心完全地移入 25mL 带塞比色管中。

分别于带塞比色管中加 2.0mL 茜素氨羧络合剂溶液、3.0mL 缓冲液、6.0mL丙酮、2.0mL 硝酸镧溶液,再加水至刻度,混匀,放置 20min,以 3cm 比色杯,以零管调节零点,测各管吸光度,绘制标准曲线比较。

5. 计算

$$x=\frac{m_1\times 1000}{m\times 1000}$$

式中 x ——样品中氟的含量,mg/kg;

m_1——样品测定液中氟的质量,μg;

m——样品的质量,g。

二、扩散-电极法

1. 原理

食品中氟化物在扩散盒内与酸作用,产生氟化氢气体,经扩散被氢氧化钠吸收。氟离子选择电极的氟化镧单晶膜对氟离子产生选择性的对数响应,氟电极和饱和甘汞电极在被测试液中,电位差可随溶液中氟离子的活度的变化而改变,电位的变化规律符合能斯特(Nernst)方程式:

$$E=E^{\circ}-2.303RT/F\lg C_{F}^{-}$$

E 与 $\lg C_{F}^{-}$ 成线性关系。$2.303RT/F$ 为该直线的斜率(25℃时为 59.16)。

与氟离子形成络合物的 Fe^{3+}、Al^{3+} 及 SiO_3^{2-} 等离子干扰测定,其他常见离子无影响。测定溶液的酸度为 pH5～6,用总离子强度调节缓冲液,消除干扰离子及酸度的影响。

2. 试剂

本方法所用水均为去离子水,所有试剂为分析纯试剂,全部试剂贮于聚乙烯塑料瓶中。

(1) 氟标准贮备液：精密称取 0.2210g 经 100℃干燥 4h 的氟化钠溶于水,

移入 100.0 mL 容量瓶中，加水至刻度，摇匀，置冰箱中保存，此溶液为 1.0mg/mL。

(2) 氟标准使用液：吸取 1.0 mL 氟标准贮备液置于 200.0 mL 容量瓶中，加水至刻度，混匀，相当于 5.0μg/mL。

(3) 0.25mol/L 氢氧化钠－乙醇溶液：称 2g NaOH 溶于乙醇中并稀释至 100.0 mL。

(4) 2%硫酸银－硫酸溶液：取 2g 硫酸银溶于 1000 mL(3:1)硫酸中。

(5) 10%氧化镁：取 10g 氧化镁溶于水并稀释至 1000 mL。

(6) 10%氢氧化钠：取 10g 氢氧化钠溶于水并稀释至 100.0 mL。

(7) 缓冲液Ⅰ：称 58g NaCl，34.8g 柠檬酸三钠，57.0 mL 冰乙酸，加 700.0 mL 去离子水，用 NaOH 调 pH 至 5.0～5.5，加水至 1L。

(8) 缓冲液Ⅱ：缓冲液Ⅰ及去离子水以 1:2 混合。

3. 仪器

(1) 氟电极：CSB—F—1 型或其他型号。

(2) 酸度计：pHS—2 型或电位计。

(3) 磁力搅拌器。

(4) 232 型甘汞电极。

(5) 扩散盒。

(6) 恒温箱。

4. 操作步骤

(1) 在扩散盒中央加入 0.2 mL 0.25mol/L 氢氧化钠－乙醇溶液，轻轻摇匀，使其布满盒盖，然后置于 55℃ 恒温箱中至蒸干后取出待用。

(2) 对于含水分高样品需进行干燥处理。取适量样品于平皿中，置于 80℃ 恒温箱中鼓风干燥，然后转入研钵中磨碎，混匀备用。计算干样占原样的百分含量。

(3) 扩散氟离子：称取 1.0g 干样于扩散盒内，加入 4.0 mL 去离子水润湿混匀后，加入 4.0 mL 2% 硫酸银－硫酸溶液迅速盖紧盒盖，水平摇动使其混匀，放置于 55℃ 恒温箱中保持 20h。取下盒盖，用 4.0 mL 去离子水分次洗涤盒盖，洗液转入小烧杯中，在小烧杯中再加入 4.0 mL 缓冲液 II，混匀，待测。

(4) 标准曲线的制备：分别取 5.0μg/mL 的氟标准使用液 0.0、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 于扩散盒中，加去离子水至 4.0mL，加入 2% 硫酸银－硫酸溶液 4.0 mL，其余同 2(2)。

(5) 测定：将氟电极依次插入氟标准系列溶液中，读出电位值，绘制标准曲线。同样方法测得样品的电位值，在标准曲线上查出含量，再换算成原样品的氟

含量。对于低于 1.0μg F/8.0mL 的，先在烧杯中加入 1.0μg 氟再测定。然后从结果中减去加入的氟即为样品的氟含量[注意：氟离子选择电极应在磁力搅拌器搅拌下测定。温度对测定有一定影响。随着温度的升高，电极的斜率增大，因此，在绘制标准曲线与测试样品时的温度要一致，不得相差 ±2℃]。

5．计算

$$x = \frac{\rho \times V \times 1000}{m \times 1000}$$

式中　x——样品氟的含量，mg/kg；

ρ——测定用样液中氟的浓度，μg/mL；

V——样液总体积，mL；

m——样品质量，g。

6．注意事项

（1）氟离子选择电极法的回收率为 95%～120%，当氟电极的响应极限为 0.025μg/mL 时，如取样量为 1g 时，最低检出限为 1.25mg/kg。

（2）氟离子选择电极法的原理是利用氟电极上的氟化镧单晶膜对溶液中氟离子有选择性的“穿透性”，氟离子通过扩散移入电极可以传导电流，而干扰离子被选择性膜滤去则不能传导电流。在一般情况下，氟电极测量的是活度，而不是浓度，当待测溶液中氟离子浓度较小，并在标准溶液和样品溶液中，同时加入相等的足够量的惰性电解质，控制溶液的离子强度，当离子强度一定时，浓度与活度相接近，不需要校正。根据 Nernst 公式，可以看出电位差与浓度的关系是对数关系，对于 1 价离子，浓度每改变 10 倍，电位值只改变 59.16mV(25℃)，通常测定这个电位值来检查一支氟电极的性能好坏。

（3）电极不宜在水中长期保存，如长期不用，应冲洗干净干放，在使用前用水浸泡数小时，待电位值平衡后可以使用。避免在高浓度溶液中长时间浸泡，以免损坏电极。一支电极长时间使用后，会发生迟钝现象，可用金相纸擦或牙膏擦，以将表面活化。

每支电极都有一定的响应极限，电极的性能越好，最低检出浓度越低。初次使用新电极应先测试其响应极限，即可计算出对样品的最低检出量。小于电极响应极限的浓度不成对数响应，测定很微量的氟会产生误差。

第十一节　食品中镉的测定方法（石墨炉原子吸收光谱法）

镉及其化合物在工业上应用广泛，包括：采矿、冶炼、电镀、电器、合金、焊接、玻璃、陶瓷、油漆、颜料、照相材料、光电池、塑料、化肥、杀虫剂等的生产制造

业。工业"三废"的排放,也不可避免存在镉对食品的污染问题。镉在一般环境中的含量相当低,但可通过食物链富集后达到相当高的浓度。由于含镉工业废水排入水体,水生生物能从水中浓集镉,其体内浓度可比水体含镉量高 4500 倍左右。甚至有报道,海产贝类的浓集系数可达 $10^5 \sim 2\times10^6$。据调查报道,非污染区贝壳类含锦量为 0.05mg/kg,而在污染区的贝壳类镉含量可高达 420mg/kg。含镉废水和废渣还可直接污染土壤,农作物从土壤中吸收镉而使其含量增高,各种不同食物被镉污染的情况差异很大,如甜菜、洋葱、豆类和萝卜最易受污染,而大麦、西红柿稍差。谷类能蓄积较多的镉,尤其是稻米。日本某镉污染区稻米中镉含量为 0.36～4.17mg/kg、我国污灌区 20 世纪 70 年代也曾受镉污染,所产稻米含镉量为 1.32～1.43mg/kg。动物性食品的肾脏部分及海产食品中的贝壳类均为含镉较高的食品。此外,有些食品容器和包装材料,特别是金属容器,也可能与食品接触中造成镉污染。

镉是蓄积性的毒物,机体甚至摄入很微量的镉,也会对肾脏产生危害。临床上出现高钙尿、蛋白尿、糖尿、氨基酸尿,最后导致负钙平衡,引起骨质疏松症。自 1968 年日本将"骨痛病"列为镉危害而引起的公害病之后,镉的安全摄入量问题引起世界各国的关注。食物是人体摄入镉的主要来源,监测各类食品中的镉含量是控制人体镉摄入量的重要预防措施。

目前食品中镉的测定方法很多,比较普遍应用的主要方法有石墨炉原子吸收光谱法、火焰原子吸收光谱法、镉试剂比色法、电感耦合等离子体光谱法和电感耦合等离子体质谱法等。其中石墨炉原子吸收光谱法是目前国际上通用的方法,被大多数国家所采用。该种方法灵敏度高、样品前处理简单方便、性价比好。在食品及商检系统被广泛应用。而火焰原子吸收光谱法、镉试剂比色法繁杂、样品分析用时长,不是灵敏度不高,就是难于掌握,目前很少使用。电感耦合等离子体光谱法使用方便,但仪器昂贵,对于食品中铅及其他重金属的分析灵敏度达不到要求,故很少使用。电感耦合等离子体质谱法是目前最灵敏的方法,但前处理要求严格,仪器昂贵,适用于标准物质定值和标准方法考核。本书主要介绍石墨炉原子吸收光谱法。

1. 原理

样品经灰化或酸消解后,样液注入原子吸收分光光度计石墨炉中电热原子化后,镉原子吸收 228.8nm 共振线,在一定浓度范围,其吸光度与铜含量成正比,与标准系列比较定量。

2. 试剂

实验用水为亚沸蒸馏水或电阻率 80 万 Ω 以上的去离子水。所有试剂要求使用优级纯或处理后不含镉的试剂。

(1) 硝酸、硫酸和高氯酸。

(2) 30%过氧化氢。

(3) 混合酸：硝酸4份，高氯酸1份。

(4) 0.5mol/L HNO_3：取31.5mL硝酸，加入500mL水中并用水稀释至1000mL。

(5) 磷酸氢二铵溶液 (20g/L)。取2.0g特纯磷酸氢二铵溶于双蒸水中定容至100mL。

(6) 镉标准贮备液：精密称取1.0000g金属镉 (99.99%)，溶于20mL 5mol盐酸中，加2滴硝酸，移入1000mL容量瓶中，以水稀至刻度，混匀，贮于聚乙烯瓶中。此溶液每毫升相当于1.000mg镉。

(7) 镉标准使用液：吸取10.0mL镉标准贮备液于100mL容量瓶中，以0.5mol/L硝酸稀释至刻度，混匀。如此多次稀释至每毫升相当于0.100μg。

3. 仪器

(1) 原子吸收分光光度计 (附石墨炉及镉空心阴极灯)。

(2) 所用玻璃仪器均需以硝酸 (1+5) 浸泡过夜，用水反复冲洗，最后用去离子水冲洗干净。

(3) 马福炉或恒温干燥箱。

(4) 瓷坩埚或压力消化器。

(5) 微波消解装置。

4. 操作步骤

(1) 样品预处理：采样和制备过程中，应注意不使样品污染。粮食、豆类去壳去杂物后，磨碎过20目筛，贮于塑料瓶中．保存备用；蔬菜、水果洗净，晾干，取可食部分捣碎备用：鱼、肉等用水洗净，取可食部分捣碎，备用。

(2) 样品消解 (根据实验条件可任选一方法)：

① 干灰化法：称取1.00～5.00g样品(根据铅含量而定)于瓷坩埚中。先小火炭化至无烟，移入马福炉(500±25)℃灰化6～8h，放冷。若个别样品不彻底。则加1mL混合酸在小火上加热，反复多次直到消化完全，放冷，用硝酸(0.5mol/L)将灰分溶解，少量多次地过滤于10～25mL容量瓶中。并定容至刻度、摇匀备用，同时作试剂空白。

② 压力消解罐法：称取0.200～2.000g样品［注意：粮食、豆类干样不得超过1g，蔬菜、水果、动物性样品控制在2g以内，水分大的样品称样后先蒸水分至近干］于聚四氟乙烯罐内，加硝酸2～4mL过夜。再加30%过氧化氢2～3mL［注意：总量不能超过内罐体积的1/3］。盖好内盖，旋紧外盖，放入恒温箱，120℃保温3～4h，自然冷却。将消化液定量转移至10mL(或25mL)容量瓶中。用少量水洗涤内罐，洗液合并于容量瓶

中并定容至刻度，混匀。同时做试剂空白。

③ 湿法消解：称取样品 1.000～5.000g 于三角烧瓶中，放数粒玻璃珠，加 10mL 混合酸（或再加 1～2mL 硝酸），加盖过夜，加一小漏斗在电炉上消解，若变棕黑色，再加混合酸。直至冒白烟，消化液无色透明，放冷移入 10～25mL 容量瓶，用水定容至刻度，摇匀。同时做试剂空白。

④ 微波消解法：精密称取 0.3000～0.5000g 于微波消化罐中，加1.0mol/L 硝酸 4mL，盖好内盖，旋紧外盖，放入微波消解装置，按照预先设定的程序（见表 6－8）进行升温消化，待消化完毕后，取出消化罐，将消化液定量移入10.0mL 或 25.0mL 比色管中，用双蒸水少量多次洗罐，稀释至刻度，混匀，即供试样液。同样做试剂空白液。

（3）测定：

① 仪器参考条件：波长 228.8nm；狭缝 0.2～1.0nm；灯电流 5～7mA；干燥温度 85℃，5s；120℃，30s；灰化温度 350℃，15～20s；原子化温度 1700～2100℃，4～5s，背景校正为氘灯或塞曼效应扣背景。

表 6－8 微波消化升温程序

步骤	1	2	3	4	5
部分功率占总功率百分比/%	100	100	100	100	100
压力/psi	20	40	85	135	175
升压时间/min	10	10	10	10	10
保压时间/min	5	5	5	5	5
排风量/%	100	100	100	100	100

注：1psi＝6.89kPa（psi：即 $1b/in^2$，是进口仪器常用非法定压力单位，为便于使用，本方法不再换算成法定压力单位）。

② 标准曲线绘制：将仪器参考仪器条件调至最佳状态。待稳定后分别吸取上面配制的镉标准使用 0.001、0.003、0.005、0.007、0.010μg/mL 各 10～20μL，或由仪器自动配制后注入石墨炉，同时吸取 20g/L 磷酸氢二铵溶液5.0μL，进样总体积 20～30.0μL，注入石墨炉，在调整好的仪器条件下测定。测得其吸光值，并求得吸光值与浓度关系的一元线性回归方程，或由仪器自动计算出标准曲线测定结果。

③ 样品测定：将试剂空白液和样液分别吸 10～20μL，或由仪器自动配制后注入石墨炉，同时吸取 20g/L 磷酸氢二铵溶液5.0μL，进样总体积 20～30.0μL，注入石墨炉，在调整好的仪器条件下测定。测得其吸光值，代入标准系列的一元线性回归方程中求得样液中铅含量，或由仪器自动计算出样品含量结果。

5. 计算

$$x=\frac{(\rho_1-\rho_2)\times V\times 1000}{m_1\times 1000}$$

式中　x——样品中镉含量，μg/kg（或 μg/L）；

ρ_1——测定样液中镉含量，μg/L；

ρ_2——空白液中镉含量，μg/L；

m_1——样品质量或体积，g（mL）；

V——样品定容总体积，mL。

［注：石墨炉原子吸收测定结果以浓度单位表示样品浓度与进样量无关］

6. 注意事项

（1）相对相差≤20%。

（2）微波消解或高压消解－石墨炉原子吸收法测定食品中的铅，经多个实验室验证，方法简便、快速，经标准参考物质核对，测得结果与保证值无显著性差异。

（3）微波消解或高压消解样品具有用酸量少、防污染及损失的优点。操作时应按规定使用，注意样品取样量不可超过规定，严格控制加热温度。

（4）石墨炉原子吸收光度法测定食品中的微量元素具有高灵敏度的特点，但原子吸收光谱的背景干扰是个复杂问题，除使用仪器本身的特殊装置，例如连续光源背景校正器、氘灯扣背景及塞曼效应背景校正技术外，选用合适的基体改进剂十分重要，我们经过多年实验经验认为磷酸氢二铵作为基体改进剂对于改善样品基体，增加灵敏度具有不可替代的作用。对复杂的样品应注意使用标准参考物质核对结果，避免产生背景干扰。

第十二节　食物中碘的测定方法

人体内的碘有90%来自于食物，所以食物中的碘含量一直是人们关注的问题。由于碘的化学性质活泼，在食物中存在的形式复杂，样品处理过程中损失严重，加之碘属于微量元素，环境中少量的碘变会引起污染，因此到目前为止，食物中碘的测定仍存在一定难度。当前，常用于食物中碘含量测定的方法如表6－9所示。

表 6－9　　常用碘含量测定法

方　法	最低检出限	适用范围
Ce－As体系催化比色法	1ng	各类食物
原子光谱分析法	0.8μg/mL	奶粉及一些碘强化食品
中子活化法	4.0ng/mL	多种动物性、植物性食物
气相色谱法	1～50ng/g	牛奶、面粉、海带等多种食物
离子色谱法	15ng/mL	碘盐

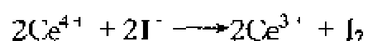
以上各种方法中，中子活化法、气相色谱法和 Ce－As 体系催化比色法均具有灵敏度高、适用范围广的特点，适于成分复杂的食物样品的检测，但由于中子活化法和气相色谱法要求的实验条件高，仪器昂贵，不适用于一般实验室的日常检测；相比之下，Ce－As 体系催化比色法操作简单、易于建立，费用较少，因此易于推广和应用。

1. 原理

砷铈接触法是利用在酸性环境中碘对亚砷酸与硫酸铈氧化还原反应的催化作用来测定碘含量：



$$2Ce^{4+} + H_3As^{3+}O_3 + H_2O \longrightarrow 2Ce^{3+} + H_3As^{5+}O_4$$



$$2Ce^{4+} + 2I^- \longrightarrow 2Ce^{3+} + I_2$$



$$I_2 + As^{3+} \longrightarrow 2I^- + As^{5+}$$

由于 Ce^{4+} 氧化碘离子成元素碘，然而元素碘又被 As^{3+} 还原成碘离子，如此反复直至 As^{3+}、Ce^{4+} 全部消耗为止，当反应条件加以控制时，则反应速度与碘离子浓度成一定数值关系，碘离子越多反应速度越快，根据硫酸铈的退色程度来进行比色定量分析，从而测定出碘的含量。本方法最低检出限 0.001μg。

2. 适用范围

适用于检测各类食物、饲料及生物样品中的碘含量。

3. 仪器

恒温水浴、马福炉、烤箱、离心机、秒表、722 分光光度计。

4. 试剂

本试验所用试剂规格必须在分析纯以上，水为无碘水或去离子水，电阻率在 500 万 Ω 以上。

(1) 0.44mol/L $ZnSO_4$：称取 100g 优级纯硫酸锌溶于少量水中，完全溶解后置于 1L 容量瓶中，加水稀释至刻度。

(2) 0.5mol/L NaOH：称取 20g 优级纯氢氧化钠溶于少量水中，完全溶解后移入 1L 容量瓶中加水稀释至刻度。

(3) 2.17mol/L K_2CO_3 溶液：称取 30g 优级纯碳酸钾溶于少量水中，完全溶解后移入 100mL 容量瓶中，加水稀释至刻度。

(4) 0.005mol/L $HAsO_2$ 溶液：准确称取三氧化二砷 0.986g，溶于温热的 15mL 0.5mol/L 氢氧化钠中，将此液加入 850mL 水中，再加入优级纯浓硫酸 39.6mL，浓盐酸 20mL，加热条件下不断搅拌直至完全溶解，冷却后移入 1L 容量瓶，加水定容至 1000mL[注意：三氧化二砷的溶解性较差，如果当时不能完全溶解，可放置过夜后再定容]。

(5) 0.02mol/L $CeSO_4$：称取硫酸铈 8.087g，溶于水中，加优级纯浓硫酸 44mL，冷却后加水定容至 1000mL。此溶液为杏黄色。

(6) 4.44mol/L NaCl：称取优级纯氯化钠 26g，溶解后定容至 100mL。

(7) 碘标准溶液：

① 碘标准贮备液(0.1mg/mL)：准确称取在 110℃烘至恒重的优级纯碘酸钾 0.1686g，用少量水溶解后移入容量瓶，最后定容至 1000mL。

② 碘标准中间液(1μg/mL)：吸取 1mL(7)①溶液定容至 100mL。

③ 碘标准使用液(0.1μg/mL)：吸取 1mL(7)②溶液定容至 10mL，用时现配。

5. 操作步骤

(1) 称取适量样品放入坩埚中，加入 0.44mol/L $ZnSO_4$ 0.5mL，2.17mol/L K_2CO_3 0.5mL 混匀后放置 1h，然后置于 110℃烤箱中，烤 14～16h，直至完全干燥[注意：①加 $ZnSO_4$ 和 K_2CO_3 的目的是为了在灰化时起到固定碘并促进消化的作用，称样量较大时，硫酸锌溶液和碳酸钾溶液的用量可加倍；但称样量不宜过大，否则会造成灰化不完全。②在 110℃条件下烘烤的目的是为了固定样品中的碘，因此一定要控制好温度，当温度过高时会导致碘的升华，导致测定结果偏低]。

(2) 将坩埚置于灰化炉中 550℃灰化 4～8h，灰化后的样品必须无明显炭粒，呈灰白色，如仍有炭粒，可加 1～2 滴水再于 110℃烤箱中烤干后，进行第二次灰化，直至完全呈灰白色[注意：①一般情况下，植物样品灰化 5～6h 即可呈灰白色，而动物样品尤其是脂肪含量较高的样品需要灰化 8h 以上方可呈灰白色。②灰化炉的升温过程最好分为 2 个阶段：250℃ 2h，550℃ 2～6h]。

(3) 加 5mL 0.005mol/L 亚砷酸溶液溶解坩埚内的样品，溶液无炭粒悬浮，并且清亮、透明，将液体移入离心管中，3000r/min 离心 5min，取上清液[注意：在坩埚中加入亚砷酸溶液后，要用玻璃棒不断搅拌，使得灰化后的样品完全溶于亚砷酸溶液中]。

(4) 在 6 支标准系列管中依次加入 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 碘标准使用液，相当 0.00、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10μg 碘。在样品管中加入适量样品液，在标准管和样品管中分别加入亚砷酸溶液，使管中溶液总体积为 5mL，然后均加入 4.44mol/L NaCl 0.5mL[注意：如果样品碘含量过高，要用亚砷酸溶液进行一定量的稀释，注意不要用去离子水]。

(5) 将以上各管摇匀后，置于(32±0.2)℃恒温水浴中，同 0.02mol/L 硫酸铈溶液一并保温 10min。

(6) 每隔 30s 将 0.5mL 0.02mol/L 硫酸铈加入一管中，迅速摇匀，放回到(32±0.2)℃恒温水浴中，在第一管加入硫酸铈溶液 15min 后每隔 30s 比色一管，波长为 410nm，比色前用水将仪器调零，读取标准系列管和样品管的吸光度值[注意：加入的硫酸铈溶液的量要准确，否则硫酸铈的退色速度与碘含量不呈相关性]。

6．计算

根据该反应原理，在反应中碘化物的催化反应速度随样品中碘化物含量的增多而加快，在半对数坐标中呈直线，故采用标准曲线回归法计算、分析结果，并根据样品吸光度值的对数查出各测定管的碘含量。

$$\lg Y = -Bm + \lg A$$

式中 $\lg Y$ ——测定样品的吸光度值的对数值；

m ——测定样品管中的碘含量(由计算器直接得出)，μg；

B ——曲线的斜率；

$\lg A$ ——曲线的截距。

测得样品管及试剂空白管的碘含量后，根据下式计算样品中的碘浓度：

$$x = \frac{f \cdot (m_1 - m_0)}{m} \times 100$$

式中 x ——测定样品中的碘浓度，$\mu g/100g$；

m_1——测定样品管中的碘含量(由计算器直接得出)，μg；

m_0——试剂空白液的碘含量，μg；

f ——稀释倍数；

m——样品质量，g。

7．注意事项

(1) 实验所用的各种玻璃容器，如试管、坩埚、刻度吸管、移液管等要用 2 mol/L 的盐酸浸泡 2h，然后再用无碘水进行冲洗。

(2) 实验台及烤箱内壁要定期用硫代硫酸钠溶液清洗，以便去除残留在实验台表面或烤箱内壁的碘。

(3) 碘测定实验台要相对独立，尽量和其他实验台隔离开，以免造成污染；实验所用各种容器不要与其他实验容器混用，以免造成污染。

第十三节　水溶性氯化物的测定方法

1．原理

经提取后的样品澄清液，在酸性条件下，加入过量硝酸银溶液使样品溶液中的氯化物形成氯化银沉淀，去除沉淀后，用硫氰酸铵回滴过量的硝酸银，根据消耗的硫氰酸铵的量，计算出其氯化物的含量。氯元素的含量检测范围为 0～60mg。

2．适用范围

参照 GB/T6439—1992 饲料中水溶性氯化物的测定方法，适用于食品及饲

料中水溶性氯化物的测定。

3．仪器

（1）实验室用样品粉碎机或研钵。

（2）分样筛：孔径 0.45mm(40 目)。

（3）分析天平：分度值 0.1mg。

（4）刻度移液管：10、2mL。

（5）移液管：50、25mL。

（6）滴定管：酸式，25mL。

（7）容量瓶：100、1000mL。

（8）烧杯：250mL。

（9）滤纸：快速，直径 15.0cm；慢速，直径 12.5cm。

4．试剂

实验用水为蒸馏水，使用试剂除特殊说明外均为分析纯。

（1）硝酸。

（2）硫酸铁(60g/L)：称取硫酸铁[$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 3H_2O$]60g 加水微热溶解后，调至 1000mL。

（3）硫酸铁指示剂：250g/L 的硫酸铁水溶液，过滤除去不溶物，与等体积的浓硝酸混合均匀。

（4）氨水：1＋19 水溶液。

（5）0.02mol/L 硫氰酸铵：称取硫氰酸铵 1.52g 溶于 1000mL 水中。

（6）氯化钠标准贮备溶液：基准级氯化钠于 500℃灼烧 1h，干燥器中冷却保存，称取 5.8454g 溶解于水中，转入 1000mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。此氯化钠标准贮备液的浓度为 0.100mol/L。

（7）氯化钠标准工作液：准确吸取 4.(6)溶液 20.00mL 于 100mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。此氯化钠标准溶液的浓度为 0.02mol/L。

（8）0.02mol/L $AgNO_3$ 标准溶液：称取 3.4g 硝酸银溶于 1000mL 水中，贮于棕色瓶内。

① 体积比：吸取硝酸银溶液 20.00mL，加硝酸 4mL，指示剂 2mL，在剧烈摇动下用硫氰酸铵溶液滴定，滴至终点为持久的淡红色，由此计算两溶液的体积比 F：

$$F = \frac{20.00}{V_2}$$

式中 F ——硝酸银与硫氰酸铵溶液的体积比；

20.00 ——硝酸银溶液的体积，mL；

V_2 ——硫氰酸铵溶液体积，mL。

② 标定：准确移取氯化钠标准溶液 10.00mL，于 100mL 容量瓶中，加硝酸 4mL，硝酸银标准溶液 25.00mL，振荡使沉淀凝结，用水稀释至刻度，摇匀，静置 5min，过滤，吸取滤液 50.00mL，加硫酸铁指示剂 2mL，用硫氰酸铵溶液滴定出现淡红棕色，且 30s 不退色即为终点。

（9）硝酸银标准溶液浓度计算：

$$c=\frac{m\times(20/1000)(10/100)}{0.05845\times(V_1-F\times V_2\times100/50)}$$

式中 c ——硝酸银标准溶液浓度，mol/L；

m ——氯化钠质量，g；

V_1 ——硝酸银标准溶液体积，mL；

V_2 ——硫氰酸铵溶液体积，mL；

F ——硝酸银与硫氰酸铵溶液的体积比；

0.05845 ——NaCl 的毫摩尔质量，g/mmol。

所得结果应表示至四位小数。

5．操作步骤

（1）选取有代表性的样品，粉碎过 40 目筛，密封保存备用。

（2）氯化物的提取：称取适量样品，准确至 0.0002g，准确加入硫酸铁溶液 50mL，氨水溶液 100mL，搅拌数分钟，放置 10min，用快速滤纸过滤。

（3）测定：准确吸取滤液 50.00mL，于 100mL 容量瓶中，加浓硝酸 10mL，硝酸银标准溶液 25.00mL，用力振荡使沉淀凝结，用水稀释至刻度，摇匀，静置 5min，过滤，吸取滤液（澄清液）50.00mL，加硫酸铁指示剂 10mL，用硫氰酸铵溶液滴定，出现淡橘红色，且 30s 不退色即为终点。

6．计算

$$w=\frac{(V_1-V_2\times F\times100/50)\times c\times150\times0.0355}{m\times50}\times100\%$$

式中 w ——氯元素含量，%；

m ——样品质量，g；

V_1 ——硝酸银溶液体积，mL；

V_2 ——滴定消耗的硫氰酸铵溶液体积，mL；

F ——硝酸银与硫氰酸铵溶液体积比；

c ——硝酸银的浓度，mol/L；

0.0355 ——Cl 元素的毫摩尔质量，g/mmol。



所得结果应表示至二位小数。

7．注意事项

（1）每个样品应取2份平行样进行测定，以其算术平均值为分析结果。

（2）氯含量在3%以下（含3%），允许绝对差0.05g，氯含量在3%以上，允许相对偏差3%。



第七章　分析检测常用数据

一、常见标准滴定溶液

（等效采用 GB/T5009.1—1996　食品卫生检验方法
理化部分　总则　附录 B）

1．盐酸标准滴定溶液

（1）配制：

① 1mol/L HCl 标准滴定溶液：量取 90mL 盐酸，加适量水并稀释至 1000mL。

② 0.5mol/L HCl 标准滴定溶液：量取 45mL 盐酸，加适量水并稀释至 1000mL。

③ 0.1mol/L HCl 标准滴定溶液：量取 9mL 盐酸，加适量水并稀释至 1000mL。

④ 0.02mol/L 及 0.01mol/L HCl 标准滴定溶液：临用前准确取已标定过的 0.1mol/L HCl 标准滴定溶液加水稀释制成。必要时重新标定浓度。

⑤ 溴甲酚绿－甲基红混合指示剂：量取 30mL 溴甲酚绿乙醇溶液(2g/L)，加 20mL 甲基红乙醇溶液(1g/L)，混匀。

（2）标定：

① 1mol/L HCl 标准滴定溶液：准确称取约 1.5g 在 270～300℃干燥至恒重的基准级无水碳酸钠，加 50mL 水使其溶解，加 10 滴溴甲酚绿－甲基红混合指示剂，用本溶液滴定至溶液由绿色转变为紫红色，煮沸 2min，冷却至室温，继续滴定至溶液由绿色转变为暗紫色。

② 0.5mol/L HCl 标准滴定溶液：按 1(2)①操作，但基准级无水碳酸钠量改为约 0.8g。

③ 0.1mol/L HCl 标准滴定溶液：按 1(2)①操作，但基准级无水碳酸钠量改为约 0.15g。

④ 同时做试剂空白实验。

（3）计算：盐酸标准滴定溶液的浓度按式 c_1 计算。

$$c_1 = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.0530}$$

式中 c_1——盐酸标准滴定溶液的实际浓度,mol/L;

m——基准级无水碳酸钠质量,g;

V_1——盐酸标准滴定溶液用量,mL;

V_2——试剂空白实验中盐酸滴定溶液用量,mL;

0.0530——$\frac{1}{2}Na_2CO_3$(无水)的毫摩尔质量,g/mmol。

2. 硫酸标准滴定溶液

(1) 配制:

① 1.0mol/L H_2SO_4 标准滴定溶液:量取30mL硫酸,缓缓注入适量水中,冷却至室温后用水稀释至1000mL,混匀。

② 0.5mol/L H_2SO_4 标准滴定溶液 按2(1)①操作,但硫酸量改为15mL。

③ 0.1mol/L H_2SO_4 标准滴定溶液 按2(1)①操作,但硫酸量改为3mL。

(2) 标定:

① 1.0mol/L H_2SO_4 标准滴定溶液 按1(2)①操作。

② 0.5mol/L H_2SO_4 标准滴定溶液 按1(2)②操作。

③ 0.1mol/L H_2SO_4 标准滴定溶液 按1(2)③操作。

④ 同时做试剂空白实验。

(3) 计算:硫酸标准滴定溶液的浓度按式 c_2 计算。

$$c_2 = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.0530}$$

式中 c_2——H_2SO_4 标准滴定溶液的实际浓度,mol/L;

m——基准无水碳酸钠质量,g;

V_1——硫酸标准滴定溶液用量,mL;

V_2——试剂空白实验中硫酸滴定溶液用量,mL;

0.0530——$\frac{1}{2}Na_2CO_3$(无水)的毫摩尔质量,g/mmol。

3. 氢氧化钠标准滴定溶液

(1) 配制:

① NaOH饱和溶液:称取120g氢氧化钠,加100mL水,振摇使之溶解成饱和溶液,冷却后置于聚乙烯塑料瓶中,密塞,放置数日,澄清后备用。

② 1.0mol/L NaOH标准滴定溶液:吸取56mL澄清的氢氧化钠饱和溶液,加少许新煮沸过的冷水至1000mL,摇匀。

③ 0.5mol/L NaOH标准滴定溶液:按3(1)②操作,但吸取澄清的氢氧化钠饱和溶液改为28mL。

④ 0.1mol/L NaOH标准滴定溶液:按3(1)②操作,但吸取澄清的氢氧化

钠饱和溶液改为5.6mL。

⑤ 0.02mol/L或0.01mol/L NaOH标准滴定溶液：临用前取已标定过的0.1mol/L NaOH标准滴定溶液，加新煮沸过的冷水稀释制成。必要时用0.01 mol/L或0.02mol/L盐酸标准溶液重新标定浓度。

⑥ 酚酞指示剂：称取酚酞1g，溶于适量乙醇中再稀释至100mL。

(2) 标定：

① 1.0mol/L NaOH标准滴定溶液：准确称取约6g在105～110℃干燥至恒重的基准级邻苯二甲酸氢钾，加80mL新煮沸过的冷水，使之尽量溶解，加2滴酚酞指示剂，用本溶液滴定至溶液呈粉红色，0.5min不退色。

② 0.5mol/L NaOH标准滴定溶液：按3(2)①操作，但基准级邻苯二甲酸氢钾量改为3g。

③ 0.1mol/L NaOH标准滴定溶液：按3(2)①操作，但基准级邻苯二甲酸氢钾量改为0.6g。

④ 同时做试剂空白实验。

(3) 计算：氢氧化钠标准滴定溶液的浓度按式c_3计算。

$$c_3 = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.2042}$$

式中 c_3——氢氧化钠标准滴定溶液的实际浓度，mol/L；

m——基准邻苯二甲酸氢钾质量，g；

V_1——氢氧化钠标准滴定溶液用量，mL；

V_2——空白实验中氢氧化钠标准滴定溶液用量，mL；

0.2042——$KHC_8H_4O_4$的毫摩尔质量，g/mmol。

4. 0.1mol/L KOH标准滴定溶液

(1) 配制：称取6g氢氧化钾，加新煮沸过的冷水溶解，并稀释至1000mL，混匀。

(2) 标定：按3(2)③和3(2)④操作。

(3) 计算：按3(3)式c_3计算。

5. 高锰酸钾标准滴定溶液

(1) 配制：

① 0.1mol/L $\frac{1}{5}KMnO_4$标准滴定溶液：称取3.3g高锰酸钾，加1000mL水。煮沸15min。加塞静置2d以上，用垂融漏斗过滤，置于具玻璃塞的棕色瓶中密闭保存。

② 0.01mol/L $\frac{1}{5}KMnO_4$标准滴定溶液：临用前取已标定过的0.1mol/L

$\frac{1}{5}KMnO_4$ 标准滴定溶液稀释制成,必要时重新标定浓度。

(2) 标定:准确称取约 0.2g 在 110℃ 干燥至恒重的基准草酸钠。加入250mL 新煮沸过的冷水,10mL 硫酸,搅拌使之溶解。迅速加入约 25mL 高锰酸钾溶液,待退色后,加热至 65℃ 继续用高锰酸钾标准溶液滴定至溶液呈微红色,保持 0.5min 不退色。在滴定终了时,溶液温度应不低于 55℃。同时做空白实验。

(3) 计算:高锰酸钾标准滴定溶液按式 c_4 计算。

$$c_4 = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.0670}$$

式中 c_4——$\frac{1}{5}KMnO_4$ 标准滴定溶液的实际浓度,mol/L;

m——基准级草酸钠的质量,g;

V_1——高锰酸钾标准滴定溶液用量,mL;

V_2——试剂空白实验中高锰酸钾标准滴定溶液用量,mL;

0.0670——$\frac{1}{2}Na_2C_2O_4$ 的毫摩尔质量,g/mmol。

6. 0.1mol/L $H_2C_2O_4$ 标准滴定溶液

(1) 配制:

① 0.1mol/L $H_2C_2O_4$ 标准滴定溶液:称取约 6.4g 草酸加适量水使之溶解并稀释至 1000mL,混匀。

② 0.01mol/L $H_2C_2O_4$ 标准滴定溶液:临用前取 0.1mol/L 已标定过的草酸标准滴定溶液稀释制成。

(2) 标定:吸取 25.0mL 草酸标准滴定溶液,按 5(2) 自"加入 250mL 新煮沸过的冷水"操作。

(3) 计算:草酸标准滴定溶液的浓度按式 c_5 计算。

$$c_5 = \frac{(V_1 - V_2) \times c}{V}$$

式中 c_5——$H_2C_2O_4$ 标准滴定溶液的实际浓度,mol/L;

V_1——高锰酸钾标准滴定溶液用量,mL;

V_2——试剂空白实验中高锰酸钾标准滴定溶液用量,mL;

c——$\frac{1}{5}KMnO_4$ 标准滴定溶液的浓度,mol/L;

V——草酸标准滴定溶液的用量,mL。

7. 0.1mol/L $AgNO_3$ 标准滴定溶液

(1) 配制:

① 称取约 17.5g 硝酸银,加入适量水使之溶解,并稀释至 1000mL,混匀。

避光保存。

② 需用少量硝酸银标准滴定溶液时,可准确称取约 4.3g 在硫酸干燥器中干燥至恒重的硝酸银(优级纯),加水使之溶解,移至 250mL 容量瓶中并稀释至刻度,混匀,避光保存。

③ 淀粉指示剂:称取 0.5g 可溶性淀粉,加入约 5mL 水,搅匀后缓缓倾入 100mL 沸水中,随加随搅拌,煮沸 2min,放冷,备用。此指示剂应临用时配制。

④ 荧光黄指示剂:称取 0.5g 荧光黄,用乙醇溶解并稀释至 100mL。

⑤ 0.01mol/L 或 0.02mol/L $AgNO_3$ 标准滴定溶液:临用前取 0.1mol/L 已标定过的 $AgNO_3$ 标准滴定溶液稀释而成。

(2) 标定:

① 采用 7(1)①配制的硝酸银标准滴定溶液的标定:准确称取约 0.2g 在 270℃干燥至恒重的基准氯化钠,加入 50mL 水使之溶解。加入 5mL 淀粉指示剂,边摇动边用硝酸银标准滴定溶液避光滴定,近终点时,加入 3 滴荧光黄指示剂,继续滴定至混浊液由黄色变为粉红色。

② 采用 7(1)②配制的硝酸银标准滴定溶液不需要标定。

(3) 计算:按(1)①配制的硝酸银标准滴定溶液的浓度按式 c_6 计算。

$$c_6 = \frac{m}{V \times 0.05844}$$

式中 c_6——$AgNO_3$ 标准滴定溶液的实际浓度,mol/L;

m——基准氯化钠的质量,g;

V——硝酸银标准滴定溶液的用量,mL;

0.05844——NaCl 的毫摩尔质量,g/mmol。

由 7(1)②配制的硝酸银标准滴定溶液的浓度按式 c_7 计算。

$$c_7 = \frac{m}{V \times 0.1699}$$

式中 c_7——$AgNO_3$ 标准滴定溶液的实际浓度,mol/L;

m——硝酸银(优级纯)的质量,g;

V——配制的硝酸银标准滴定溶液的体积,mL;

0.1699——$AgNO_3$ 的毫摩尔质量,g/mmol。

8. 0.1mol/L $\frac{1}{2}I_2$ 标准滴定溶液

(1) 配制:

① 称取 13.5g 碘,加 36g 碘化钾,50mL 水,溶解后加 3 滴盐酸及适量水并稀释至 1000mL。用垂融漏斗过滤,置于阴凉处,密闭,避光保存。

② 酚酞指示剂:称取 1g 酚酞用乙醇溶解并稀释至 100mL。

③ 淀粉指示剂：见7(1)③。

④ 0.02mol/L $\frac{1}{2}I_2$ 标准滴定溶液：临用前取已标定过的0.1mol/L $\frac{1}{2}I_2$ 标准滴定溶液稀释而成。

(2) 标定：准确称取约0.15g在105℃干燥1h的基准三氧化二砷，加入10mL氢氧化钠(40g/L)，微热使之溶解。加入20mL水及2滴酚酞指示剂，加入适量硫酸(1+35)至红色消失，再加2g碳酸氢钠，50mL水及2mL淀粉指示剂。用碘标准滴定溶液滴定至溶液呈浅蓝色。

(3) 计算：碘标准滴定溶液的浓度按式 c_8 计算。

$$c_8 = \frac{m}{V \times 0.04946}$$

式中　c_8 ——$\frac{1}{2}I_2$ 标准滴定溶液的实际浓度，mol/L；

m ——基准三氧化二砷的质量，g；

V ——碘标准溶液的用量，mL；

0.04946——$\frac{1}{4}As_2O_3$ 的毫摩尔质量，g/mmol。

9. 0.1mol/L $Na_2S_2O_3$ 标准滴定溶液

(1) 配制：

① 称取26g硫代硫酸钠及0.2g碳酸钠，加入适量新煮沸的冷水使其溶解，并稀释至1000mL，混匀，放置一个月后，过滤备用。

② 淀粉指示剂：见7(1)③。

③ 硫酸(1+8)：吸取10mL硫酸，慢慢倒入80mL水中。

④ 0.01mol/L或0.02mol/L $Na_2S_2O_3$ 标准滴定溶液：临用前取0.1mol/L已标定过的 $Na_2S_2O_3$ 标准溶液，加新煮沸过的冷水稀释制成。

(2) 标定：

① 准确称取约0.15g在120℃干燥至恒重的基准重铬酸钾，置于500mL碘量瓶中，加入50mL水使其溶解，加入2g碘化钾，轻轻振摇使其溶解。再加入20mL硫酸(1+8)，密塞，摇匀，放置暗处10min后用250mL水稀释。用硫代硫酸钠标准滴定溶液滴至溶液成浅黄绿色，再加入3mL淀粉指示剂，继续滴定至蓝色消失而显亮绿色。反应液及稀释用水的温度不应高于20℃。

② 同时做空白实验。

(3) 计算：硫代硫酸钠标准滴定溶液的浓度按式 c_9 计算。

$$c_9 = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.04903}$$

式中　c_9 ——$Na_2S_2O_3$ 标准滴定溶液的实际浓度，mol/L；

m——基准重铬酸钾的质量,g;

V_1——硫代硫酸钠标准滴定溶液的用量,mL;

V_2——试剂空白实验中硫代硫酸钠标准滴定溶液的用量,mL;

0.04903——$\frac{1}{6}K_2Cr_2O_7$ 的毫摩尔质量,g/mmol。

10. 0.05mol/L 乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)标准滴定溶液

(1) 配制:

① 0.05mol/L 乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)标准滴定溶液:称取 20g 乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$),加入 1000mL 水,加热使其溶解,冷却后摇匀。置于玻璃瓶中,避免与橡皮塞、橡皮管接触。

② 0.02mol/L 乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)标准滴定溶液:按 10(1)①操作,但乙二胺四乙酸二钠改为 8g。

③ 0.01mol/L 乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)标准滴定溶液:按 10(1)①操作,但乙二胺四乙酸二钠改为 4g。

④ 氨水-氯化铵缓冲液(pH=10):称取 5.4g 氯化铵,加适量水溶解后,加入 35mL 氨水,再加水稀释至 100mL。

⑤ 氨水(4+6):量取 40mL 氨水,加水稀释至 100mL。

⑥ 铬黑 T 指示剂:称取 0.1g 铬黑 T,加入 10g 氯化钠,研磨混合。

(2) 标定:

① 0.05mol/L 乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)标准滴定溶液:准确称取约 0.4g 在 800℃灼烧至恒重的基准级氧化锌,置于小烧杯中,加入 1mL 盐酸,溶解后移入 100mL 容量瓶,加水稀释至刻度,混匀。吸取 30~35mL 此溶液,加入 70mL 水,用氨水(4+6)中和至 pH=7~8,再加 10mL 氨水-氯化铵缓冲液(pH=10),用乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)标准滴定溶液滴定,接近终点时加入少许铬黑 T 指示剂,继续滴定至溶液自紫色转变为纯蓝色。

② 0.02mol/L 乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)标准滴定溶液:按 10(2)①操作,但基准级氧化锌量改为 0.16g;盐酸用量改为 0.4mL。

③ 0.01mol/L 乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)标准滴定溶液:按 10(2)①操作,但容量瓶改为 200mL。

④ 同时做试剂空白实验。

(3) 计算:乙二胺四乙酸二钠标准滴定溶液的浓度按式 c_{10} 计算。

$$c_{10} = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.08138}$$

式中 c_{10}——$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ 标准滴定溶液的实际浓度,mol/L;

m——用于滴定的基准级氧化锌的质量,mg;

V_1——乙二胺四乙酸二钠标准滴定溶液的用量，mL；

V_2——试剂空白实验中乙二胺四乙酸二钠标准滴定溶液的用量，mL；

0.08138——ZnO 的毫摩尔质量，g/mmol。

二、常用洗涤液的配制和使用方法

(1) 重铬酸钾－浓硫酸溶液(100g/L)(洗液)：称取化学纯重铬酸钾 100g 于烧杯中，加入 100mL 水，微加热，使其溶解。把烧杯放于水盆中冷却后，慢慢加入化学纯硫酸，边加边用玻璃棒搅动，防止硫酸溅出，开始有沉淀析出，硫酸加到一定量沉淀可溶解，加硫酸至溶液总体积为 1000mL。

该洗液是强氧化剂，但氧化作用比较慢，直接接触器皿数分钟至数小时才有作用，取出后要用自来水充分冲洗 7～10 次，最后用纯水淋洗 3 次。

(2) 肥皂洗涤液、碱洗涤液、合成洗涤剂洗涤液：配制一定浓度，主要用于油脂和有机物的洗涤。

(3) 氢氧化钾－乙醇洗涤液(100g/L)：取 100g 氢氧化钾，用 50mL 水溶解后，加工业乙醇至 1L，它适用洗涤油垢、树脂等。

(4) 酸性草酸或酸性羟胺洗涤液：称取 10g 草酸或 1g 盐酸羟胺，溶于 10mL 盐酸(1＋4)中。该洗液洗涤氧化性物质。对沾污在器皿上的氧化剂，酸性草酸作用较慢，羟胺作用快且易洗净。

(5) 硝酸洗涤液：常用浓度(1＋9)或(1＋4)，主要用于浸泡清洗测定金属离子的器皿。一般浸泡过夜，取出用自来水冲洗，再用去离子水或双蒸水冲洗。

洗涤后玻璃仪器应防止二次污染。

(6) 硝酸－盐酸洗涤液：(1＋1)硝酸与(1＋1)盐酸等量混合。主要用于微量元素测定玻璃仪器的洗涤。

三、实验室常用标准缓冲液的配制

标准缓冲液的配制

(1) pH 4.01(25℃)，苯二甲酸氢钾缓冲液：称取 110℃烘干的分析纯苯二甲酸氢钾($KHC_8H_4O_4$)10.21g 溶于蒸馏水中并稀释至 1L。

(2) pH 6.86(25℃)，磷酸型缓冲液：称取 110℃烘干的分析纯磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 3.40g 和分析纯磷酸氢二钾(K_2HPO_4)3.55g，溶于脱除 CO_2 的蒸馏水中并稀释至 1L。

(3) pH 9.18(25℃)：称取 3.18g 110℃烘干的分析纯硼酸钠($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)溶于 1L 脱除 CO_2 硼砂缓冲液的蒸馏水中。

四、实验室常用缓冲液的配制方法

甘氨酸 − HCl 缓冲液(0.05mol/L) 单位：mL

pH	0.2mol/L 甘氨酸	0.2mol/L HCl	pH	0.2mol/L 甘氨酸	0.2mol/L HCl
2.2	50	44.0	3.0	50	11.4
2.4	50	32.4	3.2	50	8.2
2.6	50	24.2	3.4	50	6.4
2.8	50	16.8	3.6	50	5.0

注：甘氨酸相对分子质量 = 75.07，0.2mol/L 甘氨酸溶液含 15.01g/L。溶液加水稀释至 200mL。

邻苯二甲酸 − HCl 缓冲液(0.05mol/L) 单位：mL

pH(20℃)	0.2mol/L 邻苯二甲酸氢钾	0.2mol/L HCl	pH(20℃)	0.2mol/L 邻苯二甲酸氢钾	0.2mol/L HCl	pH(20℃)	0.2mol/L 邻苯二甲酸氢钾	0.2mol/L HCl
2.2	5	4.670	2.8	5	2.642	3.4	5	0.990
2.4	5	3.960	3.0	5	2.032	3.6	5	0.597
2.6	5	3.295	3.2	5	1.470	3.8	5	0.263

注：邻苯二甲酸氢钾相对分子质量 = 204.23，0.2mol/L 邻苯二甲酸氢钾溶液含 40.85g/L。溶液加水稀释至 20mL。

Na_2HPO_4 − 柠檬酸缓冲液 单位：mL

pH	0.2mol/L Na_2HPO_4	0.1mol/L 柠檬酸	pH	0.2mol/L Na_2HPO_4	0.1mol/L 柠檬酸	pH	0.2mol/L Na_2HPO_4	0.1mol/L 柠檬酸
2.2	0.40	19.60	4.2	8.28	11.72	6.2	13.22	6.78
2.4	1.24	18.76	4.4	8.82	11.18	6.4	13.85	6.15
2.6	2.18	17.82	4.6	9.35	10.65	6.6	14.55	5.45
2.8	3.17	16.83	4.8	9.86	10.14	6.8	15.45	4.55
3.0	4.11	15.89	5.0	10.30	9.70	7.0	16.47	3.53
3.2	4.94	15.06	5.2	10.72	9.28	7.2	17.39	2.61
3.4	5.70	14.30	5.4	11.15	8.85	7.4	18.17	1.83
3.6	6.44	13.56	5.6	11.60	8.40	7.6	18.73	1.27
3.8	7.10	12.90	5.8	12.09	7.91	7.8	19.15	0.85
4.0	7.71	12.29	6.0	12.63	7.37	8.0	19.45	0.55

注：$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 相对分子质量 = 178.05；0.2mol/L 溶液含 35.61g/L；
柠檬酸·H_2O 相对分子质量 = 210.14；0.1mol/L 溶液含 21.01g/L。

柠檬酸 − 柠檬酸钠缓冲液(0.1mol/L) 单位：mL

pH	0.1mol/L 柠檬酸	0.1mol/L 柠檬酸三钠	pH	0.1mol/L 柠檬酸	0.1mol/L 柠檬酸三钠
3.0	18.6	1.4	5.0	8.2	11.8
3.2	17.2	2.8	5.2	7.3	12.7
3.4	16.0	4.0	5.4	6.4	13.6
3.6	14.9	5.1	5.6	5.5	14.5
3.8	14.0	6.0	5.8	4.7	15.3
4.0	13.1	6.9	6.0	3.8	16.2
4.2	12.3	7.7	6.2	2.8	17.2
4.4	11.4	8.6	6.4	2.0	18.0
4.6	10.3	9.7	6.6	1.4	18.6
4.8	9.2	10.8			

注：柠檬酸·H_2O 相对分子质量 = 210.14，0.1mol/L 溶液含 21.0g/L；柠檬酸三钠·$2H_2O$ 相对分子质量 = 294.12，0.1mol/L 溶液含 29.4g/L。

醋酸缓冲液(0.2mol/L)　　单位：mL

pH(18℃)	0.2mol/L NaAC	0.2mol/L HAC	pH(18℃)	0.2mol/L NaAC	0.2mol/L HAC
3.6	0.75	9.25	4.8	5.90	4.10
3.8	1.20	8.80	5.0	7.00	3.00
4.0	1.80	8.20	5.2	7.90	2.10
4.2	2.65	7.35	5.4	8.60	1.40
4.4	3.70	6.30	5.6	9.10	0.90
4.6	4.90	5.10	5.8	9.40	0.60

注：$NaAC \cdot 3H_2O$ 相对分子质量＝136.09，0.2mol/L溶液含27.22g/L

磷酸缓冲液(0.2mol/L)　　单位：mL

pH	0.2mol/L Na_2HPO_4	0.2mol/L NaH_2PO_4	pH	0.2mol/L Na_2HPO_4	0.2mol/L NaH_2PO_4
5.8	8.0	92	7.2	72.0	28.0
6.0	12.3	87.7	7.4	81.0	19.0
6.2	18.5	81.5	7.5	84.0	16.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3
7.0	61.0	39.0			

注：$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 相对分子质量＝178.05，0.2mol/L溶液含35.61g/L；
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 相对分子质量＝358.22，0.2mol/L溶液含71.64g/L；
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 相对分子质量＝138.0，0.2mol/L溶液含27.6g/L；
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 相对分子质量＝156.03，0.2mol/L溶液含31.21g/L；

KH_2PO_4－NaOH缓冲液(0.05mol/L)　　单位：mL

pH(20℃)	0.2mol/L KH_2PO_4	0.2mol/L NaOH	pH(20℃)	0.2mol/L KH_2PO_4	0.2mol/L NaOH
5.8	5	0.372	7.0	5	2.963
6.0	5	0.570	7.2	5	3.500
6.2	5	0.860	7.4	5	3.950
6.4	5	1.260	7.6	5	4.280
6.6	5	1.780	7.8	5	4.520
6.8	5	2.365	8.0	5	4.680

注：溶液加水稀释至20mL。

巴比妥缓冲液　　单位：mL

pH(18℃)	0.04mol/L 巴比妥钠盐	0.2mol/L HCl	pH(18℃)	0.04mol/L 巴比妥钠盐	0.2mol/L HCl
6.8	100	18.4	8.4	100	5.21
7.0	100	17.8	8.6	100	3.82
7.2	100	16.7	8.8	100	2.52
7.4	100	15.3	9.0	100	1.65
7.6	100	13.4	9.2	100	1.13
7.8	100	11.47	9.4	100	0.70
8.0	100	9.39	9.6	100	0.35
8.2	100	7.21			

注：巴比妥钠盐相对分子质量＝206.2，0.04mol/L溶液含8.25g/L。

Tris 缓冲液(0.05mol/L) 单位：mL

pH 23℃	pH 37℃	0.2mol/L Tris	0.1mol/L HCl	pH 23℃	pH 37℃	0.2mol/L Tris	0.1mol/L HCl
9.10	8.95	25	5	8.05	7.90	25	27.5
8.92	8.78	25	7.5	7.96	7.82	25	30.0
8.74	8.60	25	10.0	7.87	7.73	25	32.5
8.62	8.48	25	12.5	7.77	7.63	25	35.0
8.50	8.37	25	15.0	7.66	7.52	25	37.5
8.40	8.27	25	17.5	7.54	7.40	25	40.0
8.32	8.18	25	20.0	7.36	7.22	25	42.5
8.23	8.10	25	22.5	7.20	7.05	25	45.0
8.14	8.00	25	25.0				

注：三羟甲基氨基甲烷 $(HOCH_2)_2C(CH_2OH)(NH_2)$ 相对分子质量＝121.14，0.2mol/L溶液含 24.23g/L。

x mL 0.2mol/L 三羟甲基氨基甲烷＋y mL 0.1mol/L HCl 加水稀释至 100mL

硼酸缓冲液(0.2mol/L 硼酸盐) 单位：mL

pH	0.05mol/L 硼砂	0.2mol/L 硼酸	pH	0.05mol/L 硼砂	0.2mol/L 硼酸
7.4	1.0	9.0	8.2	3.5	6.5
7.6	1.5	8.5	8.4	4.5	5.5
7.8	2.0	8.0	8.7	6.0	4.0
8.0	3.0	7.0	9.0	8.0	2.0

注：硼砂 $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 相对分子质量＝381.43，0.05mol/L 硼砂溶液＝1L 中含 19.07g 硼砂；硼酸相对分子质量＝61.84，0.2mol/L 溶液含硼酸 12.37g/L。

硼砂易失去结晶水，必须放带塞的瓶中保存，硼砂溶液也可以用半中和的硼酸溶液代替。

甘氨酸－NaOH 缓冲液(0.05mol/L) 单位：mL

pH	0.2mol/L 甘氨酸	0.2mol/L NaOH	pH	0.2mol/L 甘氨酸	0.2mol/L NaOH
8.6	50	4.0	9.6	50	22.4
8.8	50	6.0	9.8	50	27.2
9.0	50	8.8	10.0	50	32.0
9.2	50	12.0	10.4	50	38.6
9.4	50	16.8	10.6	50	45.5

注：甘氨酸相对分子质量＝75.07，0.2mol/L 溶液含 15.01g/L。溶液加水稀释至 200mL。

硼砂－NaOH 缓冲液(0.05mol/L 硼酸根) 单位：mL

pH	0.05mol/L 硼砂	0.2mol/L NaOH	pH	0.05mol/L 硼砂	0.2mol/L NaOH
9.3	50	0.0	9.8	50	34.0
9.4	50	11.0	10.0	50	43.0
9.6	50	23.0	10.1	50	46.0

注：溶液加水稀释至 200mL。

碳酸钠－碳酸氢钠缓冲液(0.1mol/L)

Ca^{2+}.Mg^{2+}存在时不得使用　　单位：mL

pH 20℃	pH 37℃	0.1mol/L Na_2CO_3	0.1mol/L $NaHCO_3$	pH 20℃	pH 37℃	0.1mol/L Na_2CO_3	0.1mol/L $NaHCO_3$
9.16	8.77	1	9	10.14	9.90	6	4
9.40	9.12	2	8	10.28	10.08	7	3
9.51	9.40	3	7	10.53	10.28	8	2
9.78	9.50	4	6	10.83	10.57	9	1
9.90	9.72	5	5				

注：$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ 相对分子质量＝286.2，0.1mol/L溶液含28.62g/L；Na_2HCO_3 相对分子质量＝84.0，0.1mol/L溶液含8.40g/L。

五、水的体积和质量换算表

（供校准玻璃容量仪器体积用）

温度/℃	1L水在真空中质量 $1000\times m_{真}$/g	1L水在空气中质量 m_t/g	1g水所占的体积 V/mL	校正项 $1000-m_t$
10	999.70	998.39	1.00161	1.61
11	999.60	998.31	1.00169	1.69
12	999.49	998.23	1.00177	1.77
13	999.38	998.14	1.00186	1.86
14	999.26	998.04	1.00196	1.96
15	999.13	997.93	1.00207	2.07
16	998.97	997.80	1.00220	2.20
17	998.80	997.65	1.00236	2.35
18	998.62	997.51	1.00250	2.49
19	998.43	997.34	1.00267	2.66
20	998.23	997.18	1.00283	2.82
21	998.02	997.00	1.00301	3.00
22	997.80	996.80	1.00321	3.20
23	997.56	996.60	1.00341	3.40
24	997.32	996.38	1.00363	3.62
25	997.07	996.17	1.00384	3.83
26	996.81	995.93	1.00409	4.07
27	996.54	995.69	1.00433	4.31
28	996.26	995.44	1.00458	4.56
29	995.97	995.18	1.00484	4.82
30	995.67	994.91	1.00511	5.09
31	995.37	994.64	1.00539	5.36
32	995.05	994.34	1.00569	5.66
33	994.73	994.06	1.00598	5.94
34	994.40	993.75	1.00629	6.25
35	994.06	993.45	1.00659	6.55

注：在 t℃称得水重质量(mg)，则量取此质量下水的玻璃仪器体积：$V_{20}=m\times V$(mL)或 $V_{20}=\frac{m}{m_t}\times 1000$(mL)(式中 V_{20}是指玻璃容器在20℃时所具有的体积)。

六、常用酸碱指示剂及酸碱滴定指示剂的选择

酸碱指示剂

指示剂名称		配制方法	颜色		pH范围
中文	英文	0.1g溶于250mL的下列溶剂	酸	碱	
甲酚红(酸范围)	Cresol red (acid range)	水,含2.62mL0.1mol/L NaOH	红	黄	0.2~1.8
麝香草酚蓝(酸范围)	Thymol blue (acid range)	水,含2.15mL 0.1mol/L NaOH	红	黄	1.2~2.8
	Tropaeolin OO	水	红	黄	1.3~3.0
甲基黄	Methyl yellow	90%乙醇	红	黄	2.9~4.0
溴酚蓝	Bromophenol blue	水,含1.49mL 0.1mol/L NaOH	黄	紫	2.8~4.6
甲基橙	Methyl orange	自由酸：水 钠盐：水,含3mL 0.1mol/L NaOH	红	橙黄	3.1~4.4
溴甲酚绿	Bromocresol green	水,含1.43mL 0.1mol/L NaOH	黄	蓝	3.6~5.2
刚果红	Congo red	水,或80%乙醇	红紫	红橙	3.0~5.0
甲基红	Methyl red	钠盐：水 自由酸：60%乙醇	红	黄	4.2~6.3
氯酚红	Chlorophenol red	水,含2.36mL 0.1mol/L NaOH	黄	紫红	4.8~6.4
溴甲酚紫	Bromocresol purple	水,含1.85mL 0.1mol/L NaOH	黄	红紫	5.2~6.8
石蕊	Litmus	水	红	蓝	5.0~8.9
溴麝香草酚蓝	Bromothymol blue	水,含1.6mL 0.1mol/L NaOH	黄	蓝	6.0~7.6
酚红	Phenol red	水,含2.82mL 0.1mol/L NaOH	黄	红	6.8~8.4
中性红	Neutral red	70%乙醇	红	橙棕	6.8~8.0
甲酚红(碱范围)	Cresol red (basic orange)	水,含2.62mL 0.1mol/L NaOH	黄	红	7.2~8.8
间苯甲酚紫(碱范围)	*m* Cresol purple (basic orange)	水,含2.62mL 0.1mol/L NaOH	黄	紫	7.6~9.2
麝香草酚蓝(碱范围)	Thymol blue(basic orange)	水,含2.15mL 0.1mol/L NaOH	黄	蓝	8.0~9.6
酚酞	Phenolphthalein	70%乙醇(60%cellusolve)	无色	粉红	8.3~10.0
麝香草酚酞	Thymolphthalein	90%乙醇	无色	蓝	8.3~10.5
茜黄	Alizarin yellow	乙醇	黄	红	10.1~12.0
	Tropaeolin O	水	黄	橙	11.1~12.7

注：指示剂通常以0.1mol/L NaOH或0.1mol/L HCl调节至中间色调。

酸碱滴定指示剂的选择

酸	碱或盐	等电点	突跃范围	指示剂	变色范围
强	强碱	pH=7	pH4.3~9.7	酚酞 甲基橙 中性红	8~10 3.1~4.4 6.8~8
弱	强碱	pH=8.7	pH7.7~9.7	酚酞	8~10
强	弱碱	pH=5.3	pH6.3~4.3	甲基橙	3.1~4.4
多无	强碱	第一：pH=4.7 第二：pH=9.7		甲基橙 酚酞	3.1~4.4 8~10
强	盐(Na_2CO_3)	第一：pH=8.3 第二：pH=3.9		酚酞 甲基橙	8~10 3.1~4.4

七、常用酸碱浓度表

常用酸碱浓度表(市售商品)

试剂名称	相对分子质量	含量/%(质量分数)	相对密度	浓度/(mol/L)
冰乙酸	60.05	99.5	1.05(约)	17(CH_3COOH)
乙　酸	60.05	36	1.04	6.3(CH_3COOH)
甲　酸	46.02	90	1.20	23(HCOOH)
盐　酸	36.5	36~38	1.18(约)	12(HCl)
硝　酸	63.02	65~68	1.4	16(HNO_3)
高氯酸	100.5	70	1.67	12($HClO_4$)
磷　酸	98.0	85	1.70	15(H_3PO_4)
硫　酸	98.1	96~98	1.84(约)	18(H_2SO_4)
氨　水	17.0	25~28	0.8~8(约)	15($NH_3 \cdot H_2O$)

八、原子吸收分光光度法中常用的分析线

单位：nm

元素	分析线	元素	分析线	元素	分析线
Ag	328.1,338.3	Hg	253.7	Ru	349.9,372.8
Al	309.3,308.2	Ho	410.4,405.4	Sb	217.6,206.8
As	193.6,197.2	In	303.9,325.6	Sc	391.2,402.0
Au	242.8,267.6	Ir	209.3,208.9	Se	196.1,204.0
B	249.7,249.8	K	766.5,769.9	Si	251.6,250.7
Ba	553.6,455.4	La	550.1,418.7	Sm	429.7,520.1
Be	234.9	Li	670.8,323.3	Sn	224.6,286.3
Bi	223.1,222.8	Lu	336.0,328.2	Sr	460.7,407.8
Ca	422.7,239.9	Mg	285.2,279.6	Ta	271.5,277.6
Cd	228.8,326.1	Mn	279.5,403.7	Tb	432.7,431.9
Ce	520.0,369.7	Mo	313.3,317.0	Te	214.3,225.9
Co	240.7,242.5	Na	589.0,330.3	Th	371.9,380.3
Cr	357.9,359.4	Nb	334.4,358.0	Ti	364.3,337.2
Cs	852.1,455.5	Nd	463.4,471.9	Tl	276.8,377.6
Cu	324.8,327.4	Ni	232.0,341.5	Tm	409.4
Dy	421.2,404.6	Os	290.9,305.9	U	351.5,358.5
Er	400.8,415.1	Pb	216.7,283.8	V	318.4,385.6
Eu	459.4,462.7	Pd	247.6,244.8	W	255.1,294.7
Fe	248.3,352.3	Pr	495.1,513.3	Y	410.2,412.8
Ga	287.4,294.4	Pt	266.0,306.5	Yb	398.8,346.4
Gd	368.4,407.9	Rb	780.0,794.8	Zn	213.9,307.6
Ge	265.2,275.5	Re	346.1,346.5	Zr	360.1,301.2
Hf	307.3,286.6	Rh	343.5,339.7		

九、溶解性表

	Ag^{+} (1)	Hg_2^{2+} (1)	Pb^{2+} (1)	Hg^{2+}	Bi^{3+} (2)	Cu^{2+}	Cd^{2+}	As^{3+}	Sb^{3+} (2)	Sn^{2+}	Sn^{4+}	Al^{3+}	Cr^{3+}
碳酸盐,CO_3^{2-}	HNO_3	HNO_3	HNO_3	HCl	HCl	HCl	HCl	—	—	—	—	—	—
草酸盐,$C_2O_4^{2-}$ (3)	HNO_3	HNO_3	HNO_3	HCl	HCl	HCl	HCl	—	HCl	HCl	水	HCl	HCl
氟化物,F^-	水	水	水,略溶 HNO_3	水	HCl	水,略溶 HCl	水,略溶 HCl	—	水,略溶 HCl	水	水	水	水
亚硫酸盐,SO_3^{2-}	HNO_3	HNO_3	HNO_3	HCl	—	HCl	HCl	—	—	HCl	—	HCl	—
亚砷酸盐,AsO_3^{3-}	HNO_3	HNO_3	HNO_3	HCl	HCl	HCl	HCl	—	—	HCl	—	—	—
砷酸盐,AsO_4^{3-}	HNO_3	HNO_3	HNO_3	HCl	HCl	HCl	HCl	—	—	HCl	HCl	HCl	HCl
磷酸盐,PO_4^{3-}	HNO_3	HNO_3	HNO_3	HCl	HCl	HCl	HCl	—	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl
硼酸盐,BO_2^-	HNO_3	—	HNO_3	—	HCl	HCl	HCl	—	—	HCl	—	HCl	HCl
硅酸盐,SiO_3^{2-} (4)	HNO_3	—	HNO_3	—	HCl	HCl	HCl	—	—	—	—	HCl	HCl
酒石酸盐,$C_4H_4O_6^{2-}$ (3)	HNO_3	水,略溶 HNO_3	HNO_3	HCl	HCl	水	HCl	—	HCl	HCl	水	水	水
硫酸盐,SO_4^{2-}	水,略溶	水,略溶	不溶	水,略溶	水,略溶	水	水	—	HCl	水	—	水	水
铬酸盐,CrO_4^{2-}	HNO_3	HNO_3	HNO_3	HCl	HCl	水	HCl	—	—	HCl	—	—	HCl
硫化物,S^{2-}	HNO_3	王水	HNO_3	王水	HNO_3	HNO_3	HNO_3	HNO_3	浓 HCl	浓 HCl	浓 HCl	水解,HCl	水解,HCl
氰化物,CN^-	不溶	—	HNO_3	水	.	HCl	HCl	—	—	—	—	—	HCl
亚铁氰化物,$Fe(CN)_6^{4-}$	不溶	—	不溶	—	—	不溶	不溶	—	—	—	不溶	—	—
铁氰化物,$Fe(CN)_6^{3-}$	不溶	—	不溶	不溶	—	不溶	不溶	—	—	不溶	—	—	—
硫代硫酸盐,$S_2O_3^{2-}$	HNO_3	—	HNO_3	—	—	—	水	—	—	水	水	水	—
硫代氰酸盐,SCN^-	不溶	HNO_3	HNO_3	水	—	HNO_3	HCl	.	-	—	水	水	水
碘化物,I^-	不溶	HNO_3	水,略溶 HNO_3	HCl	HCl	水,略溶	水	水	水解,HCl	水	水解,HCl	水	水

溴化物,Br^-	不溶	HNO_3	不溶	水	水解,HCl	水	水	水解,HCl	水解,HCl	水解,HCl	水解,HCl	水	水
氯化物,Cl^-	不溶	HNO_3	沸水	水	水解,HCl	水	水	水解,HCl	水解,HCl	水解,HCl	水解,HCl	水	水
醋酸盐,$C_2H_3O_2^-$	水,略溶	水	水	水	水	水	水	—	—	水	水	水	水
亚硝酸盐,NO_2^-	热水	水	水	水	—	水	水	—	—	—	—	—	—
硝酸盐,NO_3^-	水	水,略溶 HNO_3	水	水	水,略溶 (HNO_3)	水	水		—			水	水
氧化物,$(O^{2-})^-$	HNO_3	HNO_3	HNO_3	HCl	HNO_3	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl,略溶	HCl	HCl
氢氧化物,OH^-	HNO_3	—	HNO_3	—	HCl	HCl	HCl	-	HCl	HCl	不溶	HCl	HCl

水＝易溶于水(100mL水中溶解至少1g以上)　HCl－易溶于盐酸　于水－易溶于水　水,略溶－略溶于水(100mL水中溶解约0.1g)

HNO_3＝易溶于硝酸　不溶＝不溶于酸的化合物　水解＝水解而析出不溶于水的产物　——并无此化合物存在,或适当的溶剂尚未确定

	Fe^{3+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Ni^{2+}	CO^{2+}	Zn^{2+}	Ba^{2+}	Sr^{2+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	Na^+	NH_4^+
碳酸盐,CO_3^{2-}	—	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	水,略溶 HCl	水	水	水
草酸盐,$C_2O_4^{2-}$(3)	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	水	水	水	水
氟化物,F^-	水,略溶 HCl	水,略溶 HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	水,略溶 HCl	HCl	不溶	HCl	水	水	水
亚硫酸盐,SO_3^{2-}	—	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	水	水	水	水
亚砷酸盐,AsO_3^{3-}	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	水	水	水
砷酸盐,AsO_4^{3-}	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	水	水	水
磷酸盐,PO_4^{3-}	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	水	水	水
硼酸盐,BO_2^-	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	水,略溶 HCl	水,略溶 HCl	HCl	水	水	水
硅酸盐,SiO_3^{2-}(4)	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	水	水	水
酒石酸盐,$C_4H_4O_6^{2-}$(3)	水	HCl	水,略溶 HCl	HCl	水	HCl	HCl	HCl	HCl	水	水	水	水

续表

	Fe^{3+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Ni^{2+}	CO^{2+}	Zn^{2+}	Ba^{2+}	Sr^{2+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	Na^+	NH_4^+
硫酸盐，SO_4^{2-}	水	水	水	水	水	水	不溶	不溶	水，微溶	水	水	水	水
铬酸盐，CrO_4^{2-}	水	—	水，略溶 HCl	HCl	HCl	水	HCl	水，略溶	水	水	水	水	水
硫化物，S^{2-}	HCl	HCl	HCl	HNO_3	HNO_3	HCl	水	水	水	水	水	水	水
氰化物，CN^-	—	不溶	HCl	HNO_3	HNO_3	HCl	水，略溶 HCl	水	水	水	水	水	水
亚铁氰化物，$Fe(CN)_6^{4-}$	不溶	不溶	HCl	不溶	不溶	不溶	水	水	水	水	水	水	水
铁氰化物，$Fe(CN)_6^{3-}$	水	不溶	不溶	不溶	不溶	HCl	水	水	水	水	水	水	水
硫代硫酸盐，$S_2O_3^{2-}$	—	水	水	水	水	水	HCl	水	水	水	水	水	水
硫代氰酸盐，SCN^-	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水
碘化物，I^-	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水
溴化物，Br^-	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水
氯化物，Cl^-	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水
醋酸盐，$C_2H_3O_2^-$	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水
亚硝酸盐，NO_2^-	水		水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水
硝酸盐，NO_3^-	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水
氧化物，(O^{2-})	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	水，略溶 HCl	HCl	水	水	—
氢氧化物，OH^-	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	水	水，略溶 HCl	水，略溶 HCl	HCl	水	水	水

注：（1）加入盐酸时，能使银、亚汞及铅的多数盐类变成不溶的氯化物。（2）多种铋及锑的盐类，能水解而析出沉淀。
（3）多种草酸盐及酒石酸盐能与过量的草酸离子或酒石酸离子生成络离子而溶解。（4）此处之溶解度指新沉淀的硅酸盐加酸使其分解后即析出胶状硅酸。

十、相当于氧化亚铜质量的葡萄糖、果糖、乳糖、转化糖质量表

单位：mg

氧化亚铜	葡萄糖	果糖	乳糖（含水）	转化糖	氧化亚铜	葡萄糖	果糖	乳糖（含水）	转化糖
11.3	4.6	5.1	7.7	5.2	61.9	26.5	29.2	42.1	28.1
12.4	5.1	5.6	8.5	5.7	63.0	27.0	29.8	42.9	28.6
13.5	5.6	6.1	9.3	6.2	64.2	27.5	30.3	43.7	29.1
14.6	6.0	6.7	10.0	6.7	65.3	28.0	30.9	44.4	29.6
15.8	6.5	7.2	10.8	7.2	66.4	28.5	31.4	45.2	30.1
16.9	7.0	7.7	11.5	7.7	67.6	29.0	31.9	46.0	30.6
18.0	7.5	8.3	12.3	8.2	68.7	29.5	32.5	46.7	31.2
19.1	8.0	8.8	13.1	8.7	69.8	30.0	33.0	47.5	31.7
20.3	8.5	9.3	13.8	9.2	70.9	30.5	33.6	48.3	32.2
22.5	9.4	10.4	15.4	10.2	72.1	31.0	34.1	49.0	32.7
23.6	9.9	10.9	16.1	10.7	73.2	31.5	34.7	49.8	33.2
24.8	10.4	11.5	16.9	11.2	74.3	32.0	35.2	50.6	33.7
25.9	10.9	12.0	17.7	11.7	75.4	32.5	35.8	51.3	34.3
27.0	11.4	12.5	18.4	12.3	76.6	33.0	36.3	52.1	34.8
28.1	11.9	13.1	19.2	12.8	77.7	33.5	36.8	52.9	35.3
29.3	12.3	13.6	19.9	13.3	78.8	34.0	37.4	53.6	35.8
30.4	12.8	14.2	20.7	13.8	79.9	34.5	37.9	54.4	36.3
31.5	13.3	14.7	21.5	14.3	81.1	35.0	38.5	55.2	36.8
32.6	13.8	15.2	22.2	14.8	82.2	35.5	39.0	55.9	37.4
33.8	14.3	15.8	23.0	15.3	83.3	36.0	39.6	56.7	37.9
34.9	14.8	16.3	23.8	15.8	84.4	36.5	40.1	57.5	38.4
36.0	15.3	16.8	24.5	16.3	85.6	37.0	40.7	58.2	38.9
37.2	15.7	17.4	25.3	16.8	86.7	37.5	41.2	59.0	39.4
38.3	16.2	17.9	26.1	17.3	87.8	38.0	41.7	59.8	40.0
39.4	16.7	18.4	26.8	17.8	88.9	38.5	42.3	60.5	40.5
40.5	17.2	19.0	27.6	18.3	90.1	39.0	42.8	61.3	41.0
41.7	17.7	19.5	28.4	18.9	91.2	39.5	43.4	62.1	41.5
42.8	18.2	20.1	29.1	19.4	92.3	40.0	43.9	62.8	42.0
43.9	18.7	20.6	29.9	19.9	93.4	40.5	44.5	63.6	42.6
45.0	19.2	21.1	30.6	20.4	94.6	41.0	45.0	64.4	43.1
46.2	19.7	21.7	31.4	20.9	95.7	41.5	45.6	65.1	43.6
47.3	20.1	22.2	32.2	21.4	96.8	42.0	46.1	65.9	44.1
48.4	20.6	22.8	32.9	21.9	97.9	42.5	46.7	66.7	44.7
49.5	21.1	23.3	33.7	22.4	99.1	43.0	47.2	67.4	45.2
50.7	21.6	23.8	34.5	22.9	100.2	43.5	47.8	68.2	45.7
51.8	22.1	24.4	35.2	23.5	101.3	44.0	48.3	69.0	46.2
52.9	22.6	24.9	36.0	24.0	102.5	44.5	48.9	69.7	46.7
54.0	23.1	25.4	36.8	24.5	103.6	45.0	49.4	70.5	47.3
55.2	23.6	26.0	37.5	25.0	104.7	45.5	50.0	71.3	47.8
56.3	24.1	26.5	38.3	25.5	105.8	46.0	50.5	72.1	48.3
57.4	24.6	27.1	39.1	26.0	107.0	46.5	51.1	72.8	48.8
58.5	25.1	27.6	39.8	26.5	108.1	47.0	51.6	73.6	49.4
59.7	25.6	28.2	40.6	27.0	109.2	47.5	52.2	74.4	49.9
60.8	26.1	28.7	41.4	27.6	110.3	48.0	52.7	75.1	50.4

续表

氧化亚铜	葡萄糖	果　糖	乳糖（含水）	转化糖	氧化亚铜	葡萄糖	果　糖	乳糖（含水）	转化糖
111.5	48.5	53.3	75.9	50.9	164.4	72.6	79.4	112.1	75.9
112.6	49.0	53.8	76.7	51.5	165.5	73.1	80.0	112.9	76.5
113.7	49.5	54.4	77.4	52.0	166.6	73.7	80.5	113.7	77.0
114.8	50.0	54.9	78.2	52.5	167.8	74.2	81.1	114.4	77.6
116.0	50.6	55.5	79.0	53.0	168.9	74.7	81.6	115.2	78.1
117.1	51.1	56.0	79.7	53.6	170.0	75.2	82.2	116.0	78.6
118.2	51.6	56.6	80.5	54.1	171.1	75.7	82.8	116.8	79.2
119.3	52.1	57.1	81.3	54.6	172.3	76.3	83.3	117.5	79.7
120.5	52.6	57.7	82.1	55.2	173.4	76.8	83.9	118.3	80.3
121.6	53.1	58.2	82.8	55.7	174.5	77.3	84.4	119.1	80.8
122.7	53.6	58.8	83.6	56.2	175.6	77.8	85.0	119.9	81.3
123.8	54.1	59.3	84.4	56.7	176.8	78.3	85.6	120.6	81.9
125.0	54.6	59.9	85.1	57.3	177.9	78.9	86.1	121.4	82.4
126.1	55.1	60.4	85.9	57.8	179.0	79.4	86.7	122.2	83.0
127.2	55.6	61.0	86.7	58.3	180.1	79.9	87.3	122.9	83.5
128.3	56.1	61.6	87.4	58.9	181.3	80.4	87.8	123.7	84.0
129.5	56.7	62.1	88.2	59.4	182.4	81.0	88.4	124.5	84.6
130.6	57.2	62.7	89.0	59.9	183.5	81.5	89.0	125.3	85.1
131.7	57.7	63.2	89.8	60.4	184.5	82.0	89.5	126.0	85.7
132.8	58.2	63.8	90.5	61.0	185.8	82.5	90.1	126.8	86.2
134.0	58.7	64.3	91.3	61.5	186.9	83.1	90.6	127.6	86.8
135.1	59.2	64.9	92.1	62.0	188.0	83.6	91.2	128.4	87.3
136.2	59.7	65.4	92.8	62.6	189.1	84.1	91.8	129.1	87.8
137.4	60.2	66.0	93.6	63.1	190.3	84.6	92.3	129.9	88.4
138.5	60.7	66.5	94.4	63.6	191.4	85.2	92.9	130.7	88.9
139.6	61.3	67.1	95.2	64.2	192.5	85.7	93.5	131.5	89.5
140.7	61.8	67.7	95.9	64.7	193.6	86.2	94.0	132.2	90.0
141.9	62.3	68.2	96.7	65.2	194.8	86.7	94.6	133.0	90.6
143.0	62.8	68.8	97.5	65.8	195.9	87.3	95.2	133.8	91.1
144.1	63.3	69.3	98.2	66.3	197.0	87.8	95.7	134.6	91.7
145.2	63.8	69.9	99.0	66.8	198.1	88.3	96.3	135.3	92.2
146.4	64.3	70.4	99.8	67.4	199.3	88.9	96.9	136.1	92.8
147.5	64.9	71.0	100.6	67.9	200.4	89.4	97.4	136.9	93.3
148.6	65.4	71.6	101.3	68.4	201.5	89.9	98.0	137.7	93.8
149.7	65.9	72.1	102.1	69.0	202.7	90.4	98.6	138.4	94.4
150.9	66.4	72.7	102.9	69.5	203.8	91.0	99.2	139.2	94.9
152.0	66.9	73.2	103.6	70.0	204.9	91.5	99.7	140.0	95.5
153.1	67.4	73.8	104.4	70.6	206.0	92.0	100.3	140.8	96.0
154.2	68.0	74.3	105.2	71.1	207.2	92.6	100.9	141.5	96.6
155.4	68.5	74.9	106.0	71.6	208.3	93.1	101.4	142.3	97.1
156.5	69.0	75.5	106.7	72.2	209.4	93.6	102.0	143.1	97.7
157.6	69.5	76.0	107.5	72.7	210.5	94.2	102.6	143.9	98.2
158.7	70.0	76.6	108.3	73.2	211.7	94.7	103.1	144.6	98.8
159.9	70.5	77.1	109.0	73.8	212.8	95.2	103.7	145.4	99.3
161.0	71.1	77.7	109.8	74.3	213.9	95.7	104.3	146.2	99.9
162.1	71.6	78.3	110.6	74.9	215.0	96.3	104.8	147.0	100.4
163.2	72.1	78.8	111.4	75.4	216.2	96.8	105.4	147.7	101.0

续表

氧化亚铜	葡萄糖	果　糖	乳糖（含水）	转化糖	氧化亚铜	葡萄糖	果　糖	乳糖（含水）	转化糖
217.3	97.3	106.0	148.5	101.5	270.2	122.7	133.1	185.1	127.8
218.4	97.9	106.6	149.3	102.1	271.3	123.3	133.7	185.8	128.3
219.5	98.4	107.1	150.1	102.6	272.5	123.8	134.2	186.6	128.9
220.7	98.9	107.7	150.8	103.2	273.6	124.4	134.8	187.4	129.5
221.8	99.5	108.3	151.6	103.7	274.7	124.9	135.4	188.2	130.0
222.9	100.0	108.8	152.4	104.3	275.8	125.5	136.0	189.0	130.6
224.0	100.5	109.4	153.2	104.8	277.0	126.0	136.6	189.7	131.2
225.2	101.1	110.0	153.9	105.4	278.1	126.6	137.2	190.5	131.7
226.3	101.6	110.6	154.7	106.0	279.2	127.1	137.7	191.3	132.3
227.4	102.2	111.1	155.5	106.5	280.3	127.7	138.3	192.1	132.9
228.5	102.7	111.7	156.3	107.1	281.5	128.2	138.9	192.9	133.4
229.7	103.2	112.3	157.0	107.6	282.6	128.8	139.5	193.6	134.0
230.8	103.8	112.9	157.8	108.2	283.7	129.3	140.1	194.4	134.6
231.9	104.3	113.4	158.6	198.7	284.8	129.9	140.7	195.2	135.1
233.1	104.8	114.0	159.4	109.3	286.0	130.4	141.3	196.0	135.7
234.2	105.4	114.6	160.2	109.8	287.1	131.0	141.8	196.8	136.3
235.3	105.9	115.2	160.9	110.4	288.2	131.6	142.4	197.5	136.8
236.4	106.5	115.7	161.7	110.9	289.3	132.1	143.0	198.3	137.4
237.6	107.0	116.3	162.5	111.5	290.5	132.7	143.6	199.1	138.0
238.7	107.5	116.9	163.3	112.1	291.6	133.2	144.2	199.9	138.6
239.8	108.1	117.5	164.0	112.6	292.7	133.8	144.8	200.7	139.1
240.9	108.6	118.0	164.8	113.2	293.8	134.3	145.4	201.4	139.7
242.1	109.2	118.6	165.6	113.7	295.0	134.9	145.9	202.2	140.3
243.1	109.7	119.2	166.4	114.3	296.1	135.4	146.5	203.0	140.8
244.3	110.2	119.8	167.1	114.9	297.2	136.0	147.1	203.8	141.4
245.4	110.8	120.3	167.9	115.4	298.3	136.5	147.7	204.6	142.0
246.6	111.3	120.9	168.7	116.0	299.5	137.1	148.3	205.3	142.6
247.7	111.9	121.5	169.5	116.5	300.6	137.7	148.9	206.1	143.1
248.8	112.4	122.1	170.3	117.1	301.7	138.2	149.5	206.9	143.7
249.9	112.9	122.6	171.0	117.6	302.9	138.8	150.1	207.7	144.3
251.1	113.5	123.2	171.8	118.2	304.0	139.3	150.6	208.5	144.8
252.2	114.0	123.8	172.6	118.8	305.1	139.9	151.2	209.2	145.4
253.3	114.6	124.4	173.4	119.3	306.2	140.4	151.8	210.0	146.0
254.4	115.1	125.0	174.2	119.9	307.4	141.0	152.4	210.8	146.6
255.6	115.7	125.5	174.9	120.4	308.5	141.6	153.0	211.6	147.1
256.7	116.2	126.1	175.7	121.0	309.6	142.1	153.6	212.4	147.7
257.8	116.7	126.7	176.5	121.6	310.7	142.7	154.2	213.2	148.3
258.9	117.3	127.3	177.3	122.1	311.9	143.2	154.8	214.0	148.9
260.1	117.8	127.9	178.1	122.7	313.0	143.8	155.4	214.7	149.4
261.2	118.4	128.4	178.8	123.3	314.1	144.4	156.0	215.5	150.0
262.3	118.9	129.0	179.6	123.8	315.2	144.9	156.5	216.3	150.6
263.4	119.5	129.6	180.4	124.4	316.4	145.5	157.1	217.1	151.2
264.6	120.0	130.2	181.2	124.9	317.5	146.0	157.7	217.9	151.8
265.7	120.6	130.8	181.9	125.5	318.6	146.6	158.3	218.7	152.3
266.8	121.1	131.3	182.7	126.1	319.7	147.2	158.9	219.4	152.9
268.0	121.7	131.9	183.5	126.6	320.9	147.7	159.5	220.2	153.5
269.1	122.2	132.5	184.3	127.2	322.0	148.3	160.1	221.0	154.1

续表

氧化亚铜	葡萄糖	果 糖	乳糖(含水)	转化糖	氧化亚铜	葡萄糖	果 糖	乳糖(含水)	转化糖
323.1	148.8	160.7	221.8	154.6	376.0	175.7	188.8	258.7	182.2
324.2	149.4	161.3	222.6	155.2	377.2	176.3	189.4	259.4	182.8
325.4	150.0	161.9	223.3	155.8	378.3	176.8	190.1	260.2	183.4
326.5	150.5	162.5	224.1	156.4	379.4	177.4	190.7	261.0	184.0
327.6	151.1	163.1	224.9	157.0	380.5	178.0	191.3	261.8	184.6
328.7	151.7	163.7	225.7	157.5	381.7	178.6	191.9	262.6	185.2
329.9	152.2	164.3	226.5	158.1	382.8	179.2	192.5	263.4	185.8
331.0	152.8	164.9	227.3	158.7	383.9	179.7	193.1	264.2	186.4
332.1	153.4	165.4	228.0	159.3	385.0	180.3	193.7	265.0	187.0
333.3	153.9	166.0	228.8	159.9	386.2	180.9	194.3	265.8	187.6
334.4	154.5	166.6	229.6	160.5	387.3	181.5	194.9	266.6	188.2
335.5	155.1	167.2	230.4	161.0	388.4	182.1	195.5	267.4	188.8
336.6	155.6	167.8	231.2	161.6	389.5	182.7	196.1	268.1	189.4
337.8	156.2	168.4	232.0	162.2	390.7	183.2	196.7	268.9	190.0
338.9	156.8	169.0	232.7	162.8	391.8	183.8	197.3	269.7	190.6
340.0	157.3	169.6	233.5	163.4	392.9	184.4	197.9	270.5	191.2
341.1	157.9	170.2	234.3	164.0	394.0	185.0	198.5	271.3	191.8
342.3	158.5	170.8	235.1	164.5	395.2	185.6	199.2	272.1	192.4
343.4	159.0	171.4	235.9	165.1	396.3	186.2	199.8	272.9	193.0
344.5	159.6	172.0	236.7	165.7	397.4	186.8	200.4	273.7	193.6
345.6	160.2	172.6	237.4	166.3	398.5	187.3	201.0	274.4	194.2
346.8	160.7	173.2	238.2	166.9	399.7	187.9	201.6	275.2	194.8
347.9	161.3	173.8	239.0	167.5	400.8	188.5	202.2	276.0	195.4
349.0	161.9	174.4	239.8	168.0	401.9	189.1	202.8	276.8	196.0
350.1	162.5	175.0	240.6	168.6	403.1	189.7	203.4	277.6	196.6
351.3	163.0	175.6	241.4	169.2	404.2	190.3	204.0	278.4	197.2
352.4	163.6	176.2	242.2	169.8	405.3	190.9	204.7	279.2	197.8
353.5	164.2	176.8	243.0	170.4	406.4	191.5	205.3	280.0	198.4
354.6	164.7	177.4	243.7	171.0	407.6	192.0	205.9	280.8	199.0
355.8	165.5	178.0	244.5	171.6	408.7	192.6	206.5	281.6	199.6
356.9	165.9	178.6	245.3	172.2	409.8	193.2	207.1	282.4	200.2
358.0	166.5	179.2	246.1	172.8	410.9	193.8	207.7	283.2	200.8
359.1	167.0	179.8	246.9	173.3	412.1	194.4	208.3	284.0	201.4
360.3	167.6	180.4	247.7	173.9	413.2	195.0	209.0	284.8	202.0
361.4	168.2	181.0	248.5	174.5	414.3	195.6	209.6	285.6	202.6
362.5	168.8	181.6	249.2	175.1	415.4	196.2	210.2	286.3	203.2
363.6	169.3	182.2	250.0	175.7	416.6	196.8	210.8	287.1	203.8
364.8	169.9	182.8	250.8	176.3	417.7	197.4	211.4	287.9	204.4
365.9	170.5	183.4	251.6	176.9	418.8	198.0	212.0	288.7	205.0
367.0	171.1	184.0	252.4	177.5	419.9	198.5	212.6	289.5	205.7
368.2	171.6	184.6	253.2	178.1	421.1	199.1	213.3	290.3	206.3
369.3	172.2	185.2	253.9	178.7	422.2	199.7	213.9	291.1	206.9
370.4	172.8	185.8	254.7	179.2	423.3	200.3	214.5	291.9	207.5
371.5	173.4	186.4	255.5	179.8	424.4	200.9	215.1	292.7	208.1
372.7	173.9	187.0	256.3	180.4	425.6	201.5	215.7	293.5	208.7
373.8	174.5	187.6	257.1	181.0	426.7	202.1	216.3	294.3	209.3
374.9	175.1	188.2	257.9	181.6	427.8	202.7	217.0	295.0	209.9

续表

氧化亚铜	葡萄糖	果　糖	乳糖（含水）	转化糖	氧化亚铜	葡萄糖	果　糖	乳糖（含水）	转化糖
428.9	203.3	217.6	295.8	210.5	460.5	220.2	235.1	318.3	227.9
430.1	203.9	218.2	296.6	211.1	461.6	220.8	235.8	319.1	228.5
431.2	204.5	218.8	297.4	211.8	462.7	221.4	236.4	319.9	229.1
432.3	205.1	219.5	298.2	212.4	463.8	222.0	237.1	320.7	229.7
433.5	205.7	220.1	299.0	213.0	465.0	222.6	237.7	321.6	230.4
434.6	206.3	220.7	299.8	213.6	466.1	223.3	238.4	322.4	231.0
435.7	206.9	221.3	300.6	214.2	467.2	223.9	239.0	323.2	231.7
436.8	207.5	221.9	301.4	214.8	468.4	224.5	239.7	324.0	232.3
438.0	208.1	222.6	302.2	215.4	469.5	225.1	240.3	324.9	232.9
439.1	208.7	223.2	303.0	216.0	470.6	225.7	241.0	325.7	233.6
440.2	209.3	223.8	303.8	216.7	471.7	226.3	241.6	326.5	234.2
441.3	209.9	224.4	304.6	217.3	472.9	227.0	242.2	327.4	234.8
442.5	210.5	225.1	305.4	217.9	474.0	227.6	242.9	328.2	235.5
443.6	211.1	225.7	306.2	218.5	475.1	228.2	243.6	329.1	236.1
444.7	211.7	226.3	307.0	219.1	476.2	228.8	244.3	329.9	236.8
445.8	212.3	226.9	307.8	219.8	477.4	229.5	244.9	330.8	237.5
447.0	212.9	227.6	308.6	220.4	478.5	230.1	245.6	331.7	238.1
448.1	213.5	228.2	309.4	221.0	479.6	230.7	246.3	332.6	238.8
449.2	214.1	228.8	310.2	221.6	480.7	231.4	247.0	333.5	239.5
450.3	214.7	229.4	311.0	222.2	481.9	232.0	247.8	334.4	240.2
451.5	215.3	230.1	311.8	222.9	483.0	232.7	248.5	335.3	240.8
452.6	215.9	230.7	312.6	223.5	484.1	233.3	249.2	336.3	241.5
453.7	216.5	231.3	313.4	224.1	485.2	234.0	250.0	337.3	242.3
454.8	217.1	232.0	314.2	224.7	486.4	234.7	250.8	338.3	243.0
456.0	217.8	232.6	315.0	225.4	487.5	235.3	251.6	339.4	243.8
457.1	218.4	233.2	315.9	226.0	488.6	236.1	252.7	340.7	244.7
458.2	219.0	233.9	316.7	226.6	489.7	236.9	253.7	342.0	245.8
459.3	219.6	234.5	317.5	227.2					

附　录

一、食品营养强化范围参考

利用现代科学技术在一些食品中强化人体必需的营养素，是改善国民营养的有效途径之一，许多国家的实践中已得到证实。从 1956 年开始，我国卫生部开始颁布食品营养强化剂管理办法，并在不同阶段给予修正和补充，强化种类也不断扩大。现在可以添加的营养素共计有 23 种。一般来说，食品强化的剂量和范围都应遵循卫生部颁布的有关标准，下表参照 GB 14880—94 和新增加品种，列出了常见的营养素强化剂量和范围，供分析测定时参考。

种类	品　种	使用范围	每千克使用量	备　注
氨基酸及含氮化合物	L-盐酸赖氨酸 L-赖氨酸天冬氨酸盐	面包、饼干和面条与面粉	1～2g 3～4g 0.3～0.5g	谷类及其制品也可按量添加
	牛磺酸	乳制品、婴幼儿食品及谷类制品、强化饮液	0.3～0.5g 0.1～0.5g	
维生素类	(视黄醇或醋酸视黄醇酯或棕榈酸视黄醇) β-胡萝卜素	芝麻油、色拉油人造奶油	4 000～8 000μg 13 300～26 600IU	维生素 A 添加量均以视黄醇当量计算 1μg β-胡萝卜素=0.167μg 视黄醇当量 1μg 视黄醇当量=1μg 视黄醇
		婴幼儿食品、乳制品	3 000～9 000μg 10 000～25 000IU	
		乳及乳饮料	600～1 000μg 2 000～3 333IU	
		液体奶	780μg	
	维生素 D: D_2(麦角钙化醇) D_3(胆钙化醇)	乳及乳饮料	10～40μg 400～1 600IU	1μg 维生素 D=40 IU 维生素 D
		人造奶油	125～156μg 5 000～6 240IU	
		乳制品	63～125μg 2 520～5 000IU	
		婴幼儿食品	50～115μg 2 000～4 000IU	
	维生素 E: d-α-生育酚 dl-α-生育酚 d-α-醋酸生育酚 dl-α-醋酸生育酚	芝麻油 人造奶油 色拉油 乳制品	100～180mg	1. 以 d-α-生育酚计算 2. 如用 dl-α-生育酚、d-α-醋酸生育酚或 dl-α-醋酸生育酚强化，须经折算其生物活性。 3. 1mg=1 IU 维生素 E
		婴幼儿食品	40～70mg	
	维生素 B_1: 盐酸硫胺素、硝酸硫胺素、核黄素及其衍生物	谷类及其制品 饮液、乳饮料	3～5mg	如固体饮料则需按稀释倍数增加使用量下同
		婴幼儿食品	4～8mg	

续表

种 类	品 种	使用范围	每千克使用量	备 注
维生素类	维生素 B_2: 核黄素及其衍生物	食盐	100～150mg	
	维生素 C: 维生素 C 磷酸酯镁 L－抗坏血酸 抗坏血酸钠盐 抗坏血酸钾盐 抗坏血酸－6－棕榈酸盐	果泥 饮液 水果罐头 夹心硬糖 婴幼儿食品 高铁谷类及其制品 强化铁芝麻粉	50～100mg 120～240mg 200～400mg 2 000～6 000mg 300～600mg 800～1 000mg 1 000mg	每天限食用 50g
	烟酸 烟酸胺	谷类及其制品 婴幼儿食品 饮液及乳饮料	40～50mg 30～40mg 10mg	
	维生素 B_6 盐酸吡多醇 5′－磷酸吡多醇	婴幼儿食品 饮液	3～4mg	
	维生素 B_{12} 氰钴胺 羟钴胺	婴幼儿食品 饮液	10～15μg	
	维生素 K 植物甲萘醌	婴幼儿食品	420～750μg	
	胆 碱	婴幼儿食品 饮液	380～790μg 50～100mg	
	肌 醇	婴幼儿食品 饮液	210～250μg 25～30mg	
	叶 酸	婴幼儿食品 孕妇、乳母专用食品	380～700μg 2 000～4 000μg	
矿物质类	铁：硫酸亚铁 乳酸亚铁	谷类及其制品 饮料 乳制品 婴幼儿食品	120～240mg 50～100mg 300～500mg	1. 以元素铁计强化量： 谷类及其制品 24～48mg/kg 饮料 10～20mg/kg 乳制品、婴幼儿配方食品 60～100mg/kg 盐、夹心糖 600～1200mg 2. 各种铁盐(含结晶水)中铁元素含量：硫酸亚铁 20%，乳酸亚铁19.39%，柠檬酸铁 16.67%，柠檬酸铁胺 14.5%，富马酸亚铁32.9%，葡萄糖酸亚铁 12% 3. 铁源也可采用猪血中提取的血红素铁，强化时以元素铁计 4. 其他铁盐如碳酸亚铁柠檬酸亚铁、延胡索酸亚铁、琥珀酸亚铁、还原铁、电解铁也都可用，强化时以铁元素计
		食盐 夹心糖	3 000～6 000mg	
	葡萄糖酸亚铁	谷类及其制品 饮料 乳制品 婴幼儿食品	200～400mg 80～160mg 480～800mg	
		食盐 夹心糖	4 800～6 000mg	
	柠檬酸铁	谷类及其制品 饮料 乳制品 婴幼儿配方食品	150～290mg 60～120mg 360～600mg	
		食盐 夹心糖	3 600～7 200mg	

续表

种类	品种	使用范围	每千克使用量	备注
矿物质类	富马酸铁铵	谷类及其制品 饮料 乳制品 婴幼儿配方食品	70～150mg 30～60mg 180～300mg	
		食盐 夹心糖	1 800～3 600mg	
	柠檬酸铁铵	谷类及其制品 饮料 乳制品 婴幼儿配方食品	160～330mg 70～140mg 400～800mg	
		食盐 夹心糖	4 000～8 000mg	
	钙：柠檬酸钙	谷类及其制品 饮料	8～16g	1. 以元素钙计强化量： 饮料 1.6～3.2g/kg 谷类及其制品 1.6～3.2g/kg 婴幼儿配方食品 3.0～6.0g/kg 2. 各种钙盐(含结晶水)中钙元素含量： 葡萄糖酸钙8.9%，碳酸钙40%，磷酸氢钙 15.9%，乳酸钙 13%，柠檬酸钙21.08% 3. 钙源亦可采用牦牛等符合卫生标准的骨粉、蛋壳粉、活性离子钙等其他钙盐，如氯化钙、甘油磷酸钙、氧化钙、硫酸钙等均可用，强化时均以元素钙计
	葡萄糖酸钙	谷类及其制品 饮料	18～36g	
	碳酸钙 生物碳酸钙	谷类及其制品 饮料 强化乳饮料	4～8g 0.52g	
		婴幼儿配方食品	7.5～15g	
	乳酸钙	谷类及其制品 饮料	12～24g	
		婴幼儿配方食品	23～46g	
	磷酸氢钙	谷类及其制品 饮料	10～20g	
		婴幼儿配方食品	19～38g	
	锌：硫酸锌 乳酸锌	乳制品 婴幼儿配方食品	130～250g 113～318mg	1. 以元素锌计强化量 饮料 10～20 mg/kg 谷类及其制品 10～20 mg/kg 乳制品 30～60mg/kg 婴幼儿配方食品 25～70mg/kg 2. 各种锌盐(含结晶水)中锌元素含量：硫酸锌22.7%，葡萄糖酸锌12.83%，乳酸锌 22.2% 3. 还可采用氯化锌、氧化锌、醋酸锌，强化时均以元素锌计
		乳饮料 饮料 谷类及其制品	50mg 40～80mg	
		食盐	500mg	
	葡萄糖酸锌	乳制品 婴幼儿配方食品	230～470mg 195～545mg	
		饮料 谷类及其制品	80～160mg	
		食盐	500mg	

续表

种　类	品　　种	使用范围	每千克使用量	备　　注
矿物质类	碘：碘化钾	食盐 婴幼儿配方食品	30～70mg 0.3～0.6mg	1. 碘化钾中含碘量为76.4%，以元素碘计，强化量为20～50mg/kg 2. 限于地方性甲状腺肿地区食用 3. 强化量为250～480μg/kg
	硒：亚硒酸钠	食盐 口服液	7～11mg 110～440μg	1. 亚硒酸钠中硒含量为45.7%，以元素硒计，强化量为3～5mg/kg 2. 强化量为50～200μg/kg 3. 也可用硒酸钠，其中硒含量为41.8%
	镁：硫酸镁 氯化镁	乳制品 婴幼儿配方食品	3 000～7 000mg 2 000～5 800mg	以元素镁计强化量 乳制品、婴幼儿配方食品为300～700mg/kg
	铜：碳酸铜 硫酸铜	乳制品 婴幼儿配方食品	5.7～7.5mg 7.5～10mg	以元素铜计强化量，乳制品婴幼儿配方食品为3～4mg/kg
	锰：氯化锰 硫酸锰	乳制品 婴幼儿配方食品	1.08～4.32mg 1.32～5.26mg	以元素锰计强化量 乳制品、婴幼儿配方食品为300～1 200μg/kg

二、保健食品标识规定

卫生部卫生监督司

第一条　为了加强对保健食品标识和产品说明书的监督管理，根据《中华人民共和国食品卫生法》(以下简称《食品卫生法》)和《保健食品管理办法》的有关要求，特制定本规定。

第二条　本规定适用于在国内销售的一切国产和进口保健食品。

第三条　本规定所用定义如下：

保健食品：系指表明具有特定保健功能的食品。即适宜于特定人群食用，具有调节机体功能，不以治疗疾病为目的的食品。

功效成分：指保健食品中产生保健作用的组分。

食品标识：即通常所说的食品标签，包括食品包装上的文字、图形、符号以及说明物。借以显示或说明食品的特征、作用、保存条件与期限、食用人群与食用方法，以及其他有关信息。

最小销售包装：指销售过程中，以最小交货单元交付给消费者的食品包装。

主要展示版面：指消费者选购商品时，在包装标签上最容易看到或展示面



积最大的表面，一般的食品销售包装至少有一个表面可用作主要展示版面。

信息版面：是紧接“主要展示版面”右侧的包装表面。如果因包装设计原因，紧接“主要展示版面”右侧的“信息版面”不能满足标签标示的要求（如折叠的包装袋）时，则“信息版面”可选择右侧版面右侧的下一个版面。

保健食品专用名称：表明保健食品的主要原料、产品物理形态、主要加工工艺等食品属性的名称。

保健食品作用名称：在保健食品名称中，用于表明保健食品主要作用的名称部分。

保健作用声明短语：以短语形式，对保健作用的简单介绍或描述。

第四条 保健食品标识与产品说明书的所有标识内容必须符合以下基本原则：

保健食品名称、保健作用、功效成分、适宜人群和保健食品批准文号必须与卫生部颁发的《保健食品批准证书》所载明的内容相一致。

应科学、通俗易懂，不得利用封建迷信进行保健食品宣传。

应与产品的质量要求相符，不得以误导性的文字、图形、符号描述或暗示某一保健食品或保健食品的某一性质与另一产品的相似或相同。

不得以虚假、夸张或欺骗性的文字、图形、符号描述或暗示保健食品的保健作用，也不得描述或暗示保健食品具有治疗疾病的功用。

第五条 保健食品标识与产品说明书的标示方式必须符合以下基本原则：

保健食品标识不得与包装容器分开。所附的产品说明书应置于产品外包装内。

各项标识内容应按本办法的规定标示于相应的版面内，当有一个“信息版面”不够时，可标于第二个“信息版面”。

保健食品标识和产品说明书的文字、图形、符号必须清晰、醒目、直观，易于辨认和识读。背景和底色应采用对比色。

保健食品标识和产品说明书的文字、图形、符号必须牢固、持久，不得在流通和食用过程中变得模糊甚至脱落。

必须以规范的汉字为主要文字，可以同时使用汉语拼音、少数民族文字或外文，但必须与汉字内容有直接的对应关系，并书写正确。所使用的汉语拼音或外国文字不得大于相应的汉字。

计量单位必须采用国家法定的计量单位。

第六条 保健食品标识与产品说明书必须标示本《办法》附件1所规定的各项内容，其标示方式必须符合本《办法》附件1所规定的相应要求。

第七条 凡保健食品标识和产品说明书的标示内容或标示方式不符合本



《办法》者，依照《食品卫生法》第四十五、四十六条处罚。

第八条 本规定由卫生部负责解释。

第九条 本规定自颁布之日起实施。

附件 1 保健食品标识与产品说明书的标示内容及其标示要求

保健食品标识和产品说明书必须标示以下内容，其标示方式应符合下列要求：

1. 保健食品名称

1.1 必须采用表明保健食品真实属性的专用名称。当以原料或功效成分名称作为专用名称时，该原料或功效成分必须是产生主要保健作用的原料或功效成分之一。

1.2 在采用表明保健食品真实属性的专用名称的同时，可使用能表明该保健食品保健作用的保健食品作用名称。当有多项保健作用时，可同时采用多个保健食品作用名称，也可采用能综合性地表明所有保健作用的保健食品作用名称。

保健食品作用名称应是词组或短语。

1.3 在采用表明保健食品真实属性的专用名称的同时，可使用“新创名称”，“牌号名称”或“商标名称”。还可同时使用按 1.2 规定所采用的保健食品作用名称。

1.4 当国家标准、行业标准中已规定了某食品的一个或几个名称时，应选用其中的一个。

1.5 不得使用国家已规定使用的药品名称；不得使用人名、地名、代号及夸大或容易误解的名称。

1.6 保健食品名称应标于最小销售包装的“主要展示版面”的明显位置。当同时使用按 1.1、1.2 和 1.3 规定所采用的专用名称、保健食品作用名称和其它名称时，这些名称应平行排行，字体可大小有别，但都应以宽大或粗体字书写，应端正、清晰、醒目，并大于其他内容的文字。

2. 保健食品标志与保健食品批准文号

2.1 当“主要展示版面”的表面积大于 100 个平方厘米时，保健食品标志最宽处的宽度不得小于 2cm；

2.2 保健食品批准文号分为上下两行，上行为“卫食健字(　　)第　号”，下行为“中华人民共和国卫生部批准”。

2.3 由卫生部颁发的保健食品标志与保健食品批准文号应并排或上下排列标于“主要展示版面”的左上方；

3. 净含量及固形物含量

3.1 按以下计量单位标明食品的净含量：



液态食品：用体积，单位为：毫升、升，或 mL、L；

固态与半固态食品：用质量，单位为：克、千克，或 g、kg；

3.2 销售包装中含有固、液两相物质的食品，除标明净含量外，还必须标明该销售包装中所有固形物的总含量，用质量或百分数表示。

3.3 同一销售包装中的保健食品分装于各容器或以相互独立的形态包装时，应在最小容器的包装上标示该容器中保健食品的净含量。同时，销售包装的保健食品净含量应标示为最小容器的数量乘以(×)最小容器中的保健食品净含量，或独立形态的保健食品数量乘以(×)单一形态的保健食品净含量；

3.4 净含量应标于“主要展示版面”的右下方，应与“主要展示版面”的底线相平行。

4. 配料

4.1 各种配料必须按其使用量大小依递减顺序排列。食品添加剂列于后。

4.2 如果某种配料是由两种以上的其他配料构成的复合配料，标示该复合配料时，应在其名称后的括号内按使用量依递减顺序列出构成该复合配料的原始配料名称。

4.3 配料、复合配料、原始配料的名称必须使用能表明该配料真实属性的专用名称，或国家、行业标准中的规定名称。食品添加剂名称必须使用 GB 2760《食品添加剂使用卫生标准》中的规定名称，营养强化剂名称必须使用 GB 14880《食品营养强化剂使用卫生标准》中的规定名称；

4.4 配料应标于“信息版面”的上方或右侧，标题为“配料表”。

5. 功效成分

5.1 所有功效成分均以每 100g 或 100mL，或每份食用量的保健食品计算其实际含量，实际含量可以用平均值表示，也可以用含量范围表示。实测值的允许偏差范围参照相应的国家标准、行业标准或企业标准执行。

5.2 能量

5.2.1 凡通过调整食品中的能量产生保健作用的保健食品，必须标示食品中的能量含量。

5.2.2 能量以 kJ(kcal)表示。

5.3 营养素

5.3.1 已列入 14880《食品营养强化剂使用卫生标准》的营养素，其名称应使用该标准规定的名称。

5.3.2 各营养素的单位如下所列：

蛋白质、氨基酸及含氮化合物以 g 为单位；

脂肪及脂类物质以 g 或 mg 为单位；

总碳水化合物以及分类碳水化合物以 g 为单位，应以百分比标示其中的蔗糖含量；

膳食纤维以 g 为单位；

维生素以 mg、μg 或国际单位为单位；

矿物质以 g、mg、μg 为单位。

5.4 其他功效成分

其他功效成分依不同物质以 g、mg、μg 或其他单位标示。微生态产品需标示在保质期内所含每种活性生物体的数量。

5.5 功效成分应标于“信息版面”，位于“配料表”之后，标题为“功效成分表”。

5.6 “功效成分表”应以表格形式排列，各功效成分以产生保健作用的大小依递减顺序排列(见附件 2)。

6. 保健作用

6.1 保健作用应与卫生部颁发的《保健食品批准证书》所载明的内容相同。

6.2 不得用“治疗”、“治愈”、“疗效”、“痊愈”、“医治”等词汇描述和介绍产品的保健作用，也不得以图形、符号或其他形式暗示前述意思。

6.3 保健作用应标于“信息版面”，位于“功效成分表”之后，标题为“保健作用”。

6.4 可在“主要展示版面”的保健食品名称附近标示保健作用声明短语，短语的字体不能大于保健食品名称的最大部分。

7. 适宜人群

7.1 适宜人群的分类与表示应明确。

7.2 当保健食品不适宜于某类人群时，应在“适宜人群”之后，标示不适宜食用的人群，其字体应略大于“适宜人群”的内容。

7.3 适宜人群应标于“信息版面”，位于“保健作用”之后，标题为“适宜人群”。

8. 食用方法

8.1 应准确标示每日食用量和/或每次食用量。食用量可以质量或体积数表示，如××g，××mL。也可以每份量表示，如只、瓶、袋、匙……。

8.2 如销售包装中有小包装时，食用量应与小包装的净含量有对应关系。如小包装的净含量为 10mL，食用量可标示为每次 10mL。

8.3 如不同的适宜人群应按不同食用量摄入时，食用量应按适宜人群分类标示。如儿童每日食用量：10g，成人每日食用量：20g。

8.4 应标示保健食品食用前的调制、勾兑、加工等方法，可用图形或符号辅

以说明。

8.5 当保健食品的食用量过大会对人体产生不良影响或不适宜于发挥保健作用时，应在食用方法后，标示不适宜的食用量，其字体应略大于“食用量”的内容。

8.6 必要时，应标示食用保健食品时的食物禁忌或其他注意事项。

8.7 食用方法应标于“信息版面”，位于“食用量”之后，标题为“食用方法”。

9. 日期标示

9.1 保质期的标示可采用下列方式：

A 保质期……个月

B 保质期至……

C 在……之前食(饮)用

D ……之前食(饮)用

9.2 日期的标示为年－月－日，如 1996－08－12。

9.3 生产日期和保质期应标于“信息版面”，位于“食用方法”之后，标题为“生产日期”和“保质期”。

10. 贮藏方法

如保健食品的保质期与贮藏方法有关，应标示其贮藏条件与贮藏方式。

保健食品的贮藏方法应标于“信息版面”，标题为“贮藏方法”。

11. 执行标准

必须标示所执行的标准代号和编号。

执行标准应标于“信息版面”，标题为“执行标准”。

12. 保健食品生产企业名称与地址

12.1 保健食品制造、分装、包装的企业名称和地址，进口保健食品的国内进口商或经销代理商的名称和地址必须与依法登记注册的相一致。

12.2 进口保健食品必须标示原产国、地区(港、澳、台)名称及国内进口商或经销代理商的名称。

12.3 保健食品制造、分装、包装的企业名称，进口保健食品的制造企业及其原产国(地区)的名称可标于“主要展示版面”，也可标于“信息版面”。在“主要展示版面”时，应标于“主要展示版面”的下方，并与底线相平行。

保健食品制造、分装、包装企业的地址，进口保健食品的国内进口商或经销代理者的地址应标于“信息版面”，位于“执行标准”后。

13. 特殊标识内容

13.1 经电离辐射处理过的保健食品，必须在“主要展示版面”的保健食品名称附近标明“辐照食品”或“本品经辐照”。



13.2 经电离辐射处理过的任何配料，必须在配料表中的该配料名称后标明“经辐照”。

13.3 应在“主要展示版面”的右下方的明显位置标示卫生部颁发的《保健食品批准证书》中载明的“警示性标识内容”。

附件 2 功效成分表的标示方式

示例 1 功效成分表

每 100g（100mL 或每份食用量）中：

人参皂苷	500mg
香菇多糖	40mg
维生素 C	100mg
……	

示例 2 功效成分表

每 100g（100mL 或每份食用量）中：

人参皂苷	500～1000mg
香菇多糖	30～40mg
维生素 C	≥100mg
……	

三、美国和欧盟对主要营养素含量声明的定义

声明术语	营养素名称	美国 每份(per server)	欧盟 g/100g,g/100mL
无 Free, zero Without	脂肪 Fat	≤0.5g	≤0.15g≤0.0015g
	糖 Sugar	≤0.5g	≤0.5g
	胆固醇 Cholesterol	≤2mg	
	钠 Na	≤5mg	≤0.5g
低	脂肪 Fat	≤3mg	≤3g≤1.5g
	糖 Sugar	≤50mg	
	胆固醇 Cholesterol	≤20mg	≤20mg≤10mg
	钠 Na	≤140mg	
高 Rich in Excellent of	蛋白质 Protein	≥20%DEVs	≥20%RDA
	维生素 Vitamins	≥20%RDIs	≥20%～30%RDA
	矿物质 Minerals	≥20%RDIs	≥20%～30%RDA
	膳食纤维 DF	≥20%DRVs	≥4%
好的来源 Good source of	蛋白质 Protein	=10%～19%DRAs	≥10%RDA
	维生素 Vitamins	=10%～19%RDIs	≥10%～15%RDA
	矿物质 Minerals	=10%～19%RDIs	≥10%～15%RDA
	膳食纤维 DF	=10%～19%DRVs	≥2%



四、国际单位制的基本单位

国际计量大会推荐采用的一种一贯单位制，常以下列 7 个基本单位为基础：

量的单位	单位名称	单位符号
长　度	米	m
质　量	千克	kg
时　间	秒	s
电　流	安(培)	A
热力学单位	开(尔文)	k
物质的量	摩(尔)	mol
发光强度	坎(德拉)	cd

常用物理量的法定单位与符号

量的单位	单位名称	单位符号
面　积	平方米	m^2
	平方厘米	cm^2
	平方毫米	mm^2
体积、容积	立方米	m^3
	立方厘米	cm^3
	立方毫米	mm^3
时　间	秒	s
	分	min
	(小)时	h
	天	d
质　量	千克	kg
	吨	t
	克	g
	毫克	mg
	微克	μg
电　流	安(培)	A
	千安(培)	kA
	毫安(培)	mA
	微安(培)	μA
	纳安(培)	nA
电　位	伏(特)	V
	千(伏)	kV
	毫(伏)	mV
	微(伏)	μV
功　率		W
物质的量	摩(尔)	mol
	千摩(尔)	kmol
	毫摩(尔)	mmol
	微摩(尔)	μmol
物质的量浓度	摩(尔)每升	mol/L

五、美国新营养标签版式

简练全项目标签版式

Chili with Beans*

营养指南	Nutrition Facts	
份餐规格	Serving Size 1 cup (253 g)	
	Servings Per Container 4	每包份数
每份含量	Amount Per Serving	
热值	Calories 260 Calories from Fat 70	脂肪产生的热值
	% Daily Value*	占日摄入参考值的%
总脂肪	Total Fat 8g 13%	
饱和脂肪	Saturated Fat 3g 17%	
胆固醇	Cholesterol 130mg 44%	
钠	Sodium 1010mg 42%	
总碳水化合物	Total Carbohydrate 22g 7%	
维生素 A	Dietary Fiber 9g 36%	
糖	Sugars 4g	
蛋白质	Protein 25g	
维生素	Vitamin A 35% • Vitamin C 2%	维生素C
钙	Calcium 6% • Iron 30%	铁
	Percent Daily Values are based on a 2,000 calorie diet. Your daily values may be higher or lower depending on your calorie needs:	以上日摄入参考质的%，以日摄入热值2000千卡为基础计算所得，可根据你的热值需要或高或低。

			Calories:	2,000	2,500
日摄入总热值					
总脂肪（不多于）	Total Fat	Less than	65g	80g
饱和脂肪（不多于）	Sat Fat	Less than	20g	25g
胆固醇（不多于）	Cholesterol	Less than	300mg	300mg
钠（不多于）	Sodium	Less than	2,400mg	2,400mg
总碳水化合物	Total Carbohydrate		300g	375g
食物纤维	Dietary Fiber		25g	30g

每克物质产生的热值 — Calories per gram:

脂肪 — Fat 9 • Carbohydrate 4 •（碳水化合物）Protein 4 — 蛋白质

元素周期表

原子序数→19 K←元素符号
元素名称→钾
注 * 的是人造元素
39.098₃ ← 相对原子质量

注：
1. 相对原子质量录自1985年国际相对原子质量表，以 $^{12}C=12$ 为基准。相对原子质量末位数印正常字体的准至±1，印小号字的准至±3。
2. 下方加括号的数字是最稳定同位素的质量数。

周期	IA	IIA	IIIB	IVB	VB	VIB	VIIB	VIII			IB	IIB	IIIA	IVA	VA	VIA	VIIA	0	电子层	0族电子数
1	1 H 氢 1.0079																	2 He 氦 4.00260	K	2
2	3 Li 锂 6.94_1	4 Be 铍 9.01218											5 B 硼 10.81	6 C 碳 12.011	7 N 氮 14.0067	8 O 氧 15.999_4	9 F 氟 18.998403	10 Ne 氖 20.17_9	L K	8 2
3	11 Na 钠 22.98977	12 Mg 镁 24.305											13 Al 铝 26.98154	14 Si 硅 28.085_5	15 P 磷 30.97376	16 S 硫 32.06	17 Cl 氯 35.453	18 Ar 氩 39.94_8	M L K	8 8 2
4	19 K 钾 39.098_3	20 Ca 钙 40.08	21 Sc 钪 44.9559	22 Ti 钛 47.9_0	23 V 钒 50.9415	24 Cr 铬 51.996	25 Mn 锰 54.9380	26 Fe 铁 55.84_7	27 Co 钴 58.9332	28 Ni 镍 58.70	29 Cu 铜 63.54_6	30 Zn 锌 65.38	31 Ga 镓 69.72	32 Ge 锗 72.5_9	33 As 砷 74.9216	34 Se 硒 78.9_6	35 Br 溴 79.904	36 Kr 氪 83.80	N M L K	8 18 8 2
5	37 Rb 铷 85.467_8	38 Sr 锶 87.62	39 Y 钇 88.9059	40 Zr 锆 91.22	41 Nb 铌 92.9064	42 Mo 钼 95.94	43 Tc 锝 (99)	44 Ru 钌 101.0_7	45 Rh 铑 102.9055	46 Pd 钯 106.4	47 Ag 银 107.868	48 Cd 镉 112.41	49 In 铟 114.82	50 Sn 锡 118.6_9	51 Sb 锑 121.7_5	52 Te 碲 127.6_0	53 I 碘 126.9045	54 Xe 氙 131.30	O N M L K	8 18 18 8 2
6	55 Cs 铯 132.9054	56 Ba 钡 137.33	57-71 La-Lu 镧系	72 Hf 铪 178.4_9	73 Ta 钽 180.947_9	74 W 钨 183.8_5	75 Rc 铼 186.207	76 Os 锇 190.2	77 Ir 铱 192.2_2	78 Pt 铂 195.0_9	79 Au 金 196.9665	80 Hg 汞 200.5_9	81 Tl 铊 204.3_7	82 Pb 铅 207.2	83 Bi 铋 208.9804	84 Po 钋 (209)	85 At 砹 (210)	86 Rn 氡 (222)	P O N M L K	8 18 32 18 8 2
7	87 Fr 钫 (223)	88 Ra 镭 226.0254	89-103 Ac-Lr 锕系	104 Rf 𬬻* (261)	105 Ha 𬭊* (262)	106 Unh* (263)	107 Uns* (262)	108 Uno* (265)	109 Une* (266)											

镧系	57 La 镧 138.905_5	58 Ce 铈 140.12	59 Pr 镨 140.9077	60 Nd 钕 144.2_4	61 Pm 钷 (147)	62 Sm 钐 150.4	63 Eu 铕 151.96	64 Gd 钆 157.2_5	65 Tb 铽 158.9254	66 Dy 镝 162.5_0	67 Ho 钬 164.9304	68 Er 铒 167.2_6	69 Tm 铥 168.9342	70 Yb 镱 173.0_4	71 Lu 镥 174.96_7
锕系	89 Ac 锕 227.0278	90 Th 钍 232.0381	91 Pa 镤 231.0359	92 U 铀 238.029	93 Np 镎 237.0482	94 Pu 钚 (244)	95 Am 镅* (243)	96 Cm 锔* (247)	97 Bk 锫* (247)	98 Cf 锎* (251)	99 Es 锿* (254)	100 Fm 镄* (257)	101 Md 钔* (258)	102 No 锘* (259)	103 Lr 铹* (260)

参 考 文 献

1. 杨月欣. 国内外食品营养标签法规. 中国食物与营养. 2000,4:45~46

2. driskal, w. j. etal. Me asurement of Vitamin A and Vitamin E in Human Serum by High Performance Liquid chromatogr., 1982.231:439

3. Cunico. R. L et al. Compavision of ninhydrin and OPA postcolumn detection techniques for HPLC of free amino acid, J. Chromotography, 1983, 266. 461~470

4. Gehrke. C. W. et al Focus. Amino acid analysis. J. AOAC. 1985, 68(5),. 811~820

5. 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. 食物营养成分测定法. 北京：人民卫生出版社,1991

6. 中国惠普. 氨基酸应用专集. 惠普应用通讯,1995

7. Sommerfield M. Trans unsaturated fatty acids in natural products and processed foods. Prog Lipid Res, 1983, 22. 221~233

8. 8 Adam DJD, Hansen AE, Wiese HF. Essential fatty acids in infant nutrition. J Nutr, 1958, 66. 555~564

9. Bruno Stancher et aL: HPLC of the unsaponifiable from Samples of marine and freshwater fish, J. Chromatogr, 1984. 287:353

10. Sidney Williams (Ed). Official methods of Analysis of AOAC. 14th. Ed, AOAC Chemists, 1984, 833

11. Noman AW Vitamin D: the calcium homeostatic steroid hormone. Academic Press, New York, 1979

12. Okamura WH, Palenzuela JA, Plumet J. Midland MM Vitamin D. structure－function analysis and the design of analogs. J Cell Biochem, 1992, 49. 10~18

13. 王竹,王光亚. 蔬菜中维生素 K_1 的测定——HPLC法. 营养学报,1999,21

14. Determination of total. soluble and insoluble dietary fiber in foods－Enzymatic－Gravimetric Methods. Mes－TRIS buffer collaborative study. J. AOAC int., 1992, 75. 395

15. 杨晓莉,杨月欣,周瑞华等. 食品中总的、不溶性及可溶性膳食纤维的测定——酶－重量法. 卫生研究,2001,30(6)

16. 美国公职分析化学家协会. 公定分析方法(第十五版). 北京：中国科学技术出版社,1990,1195~1160

17. 食品卫生标准汇编(2). 中国预防医学科学院标准处. GB 12392—90,中国标准出版社,1992. 291－294(维生素 C)

18. 美国公职分析化学家协会：公定分析方法(第十五版),北京：中国科学技术出版社,1990. 1203~1205

19. Leklem JE, Reynolds RD, eds: (1980) Methods in Vitamin B_6 nutrition. new York: analysis and assessment. Plenum Press,

20. 周瑞华,杨晓莉,王光亚. 食品中维生素 B_6 的测定. 食品卫生标准汇编(5). 中国预防医学科学院标准处. GB 17407--1998. 1999. 267~270

21. 闻芝梅,陈君石主译. 现代营养学. 北京：人民卫生出版社,1998. 215~225

22. 王竹. 样品前处理对食物中叶酸测定的影响. 卫生研究,2000,29:404



23. 王竹. 部分食物中叶酸含量及北京居民叶酸摄人量. 营养学报,2001,23

24. Gerald Angyal: Methods for Microbiological Analysis of Selected Nutrients, 1996

25. 美国公职分析化学家协会. 公定分析方法(第十五版). 北京: 中国科学技术出版社,1990. 1197～1198

26. 闻芝梅,陈君石主译. 现代营养学. 北京: 人民卫生出版社,1998. 215～225

27. Gerald Angyal: Methods for Microbiological Analysis of Selected Nutrients, 1996

28. Jorg Augustin, Barbara P. Klein, Debouah Becker, Paul B. Venugopal: Method for Vitamin Assy. 4th edition, 1985

29. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th version

30. 石磊. 食物中泛酸测定方法. 卫生研究,2001,30(6)

31. 沈治平,王光亚,范文询等. 灰分测定法. 食物营养成分测定法. 北京: 人民卫生出版社,1954. 81

32. 苏雁,高俊全,王淮洲. 总膳食研究中重金属测定方法. 卫生研究 1993,22(增刊 1) 55～58

33. 杨惠芬,李明元,沈文. 食品卫生理化检验标准手册. 北京: 中国标准出版社,1998. 101～114

34. 中华人民共和国国家标准. 食品卫生检验方法. 理化部分. 北京: 中国标准出版社,1997. 37～44

35. 李筱薇,朱丽,周雪飞,高俊全. 总膳食研究中氟的测定方法. 卫生研究,1998. 1. 66～68

36. Mahesh DL, et al: A sensitive Kinetic Assay for the determination of Iodine in Foodstuffs. Food chemistry, 1992. 43(1) 51

37. Garcia MS, et al: Kinetic Determination of Iodine in Pharmaceutical and Food Sample. Analyst, 1991. 116 (6).653

38. Wang Guang－ya, Zhou Rui-hua, Wang Zhu, et al. Effects of Storage and Cooking on the iodine content in iodized salt and study on monitoring iodine content in iodized salt. Biomedical and environmental sciences, 1999, 12: 1～9

39. 王光亚等. 生物样品、水及土壤中痕量硒的荧光测定法. 卫生研究 1983,12:1

40. Champ M. Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. Eu J Clin Nutr, 1992, 46 (S2):S51～S62

41. Eglyst HN, Kingman SM, Hudson GJ, et al. Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. Br J Nutr, 1996, 75 (5):749～755

42. 美国公职分析化学家协会. 公定分析方法(第十五版),北京: 中国科学技术出版社,1990. 1159～1160

43. American Association of Cereal Chemists: AACC Approved Method. 8th ed. 1983, 86

